

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

MATHEUS AFONSO SCHEFER

**A resposta transcricional imediata ao hormônio juvenil no corpo gorduroso de larvas
de *Apis mellifera***

Ribeirão Preto

2019

MATHEUS AFONSO SCHEFER

**A resposta transcricional imediata ao hormônio juvenil no corpo gorduroso de larvas
de *Apis mellifera***

VERSÃO ORIGINAL

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

Orientador: Prof. Dr. Klaus H. Hartfelder

Ribeirão Preto

2019

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

Schefer, Matheus Afonso

A resposta transcricional imediata ao hormônio juvenil no corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera* /Matheus Afonso Schefer; orientador: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder. - Ribeirão Preto, 2019.

87p; 30cm

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

1- Hormônio Juvenil; 2- Atividade mitocondrial; 3- Expressão gênica; 4- Sequenciamento de nova geração.

Nome: Schefer, Matheus Afonso

Título: A resposta transcricional imediata ao hormônio juvenil no corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera*

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e grande amigo, Denilson

AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao professor Klaus Hartfelder por toda a dedicação em ensinar e ajudar, sempre muito solícito e com uma liderança empática. Sua postura e trajetória é um exemplo para todos do laboratório.
- Aos meus pais e meu irmão que sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio necessário mesmo quando eu quis desistir de tudo.
- Aos colegas de laboratório, Mário, Douglas, Carlos, Carol, Denyse, Giovana e Marina.
- Um agradecimento especial ao Douglas que me co-orientou e seguiu junto comigo neste trabalho, não somente como profissional, mas como um amigo.
- Aos professores e alunos do LBDA que sempre estão prontos pra ajudar um ao outro.
- A professora Luciane Alberici que cedeu o tempo e o laboratório para a realização de alguns experimentos cruciais deste trabalho.
- Ao Alan Lorenzetti que fez um trabalho fantástico de bioinformática e sua orientadora Prof. Tiê.
- Aos técnicos do apiário Luiz e Jairo e ao técnico de laboratório Anderson.
- Aos meus amigos mais próximos que também trilham o caminho das pedras, mas sempre com muita alegria e carinho um pelo outro: Bráulio, Haroldo, Carlos Jr., Xadau, Moto, Gina, Davi e Lagosta.
- Aos amigos da luta diária há tantos anos, mas com muito amor, João Guilherme e Higor.
- Aos amigos de Londrina que mesmo com a distância e falta de tempo, continuam presentes.
- A todos que de alguma forma passaram pela minha vida nesses últimos dois anos e tornaram o caminho mais dócil.

“E uma das condições necessárias a pensar certo é não estarmos demasiado certos de nossas certezas.”

Paulo Freire.

RESUMO

SCHEFER, M. A. **A resposta transcricional imediata ao hormônio juvenil no corpo gorduroso de larvas de *Apis mellifera***. 2019. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2019.

A diferenciação das castas na abelha melífera *Apis mellifera* é regulado pela interação do hormônio juvenil (HJ) com as vias de sensoriamento de nutrientes (IIS, TOR e EGFR) e, através da sinalização de hipóxia, associada a uma dinâmica mitocondrial casta-específica no corpo gorduroso, que é o centro metabólico dos insetos. Larvas de rainhas apresentam maiores títulos de HJ e maior taxa respiratória que larvas de operárias. No entanto, não sabemos como esses fatores são funcionalmente conectados. Nesse projeto investigamos a resposta transcricional e fisiológica imediata do HJ em larvas operária, especificamente no corpo gorduroso. A hipótese foi que a aplicação tópica deste hormônio em larvas operárias possa mimetizar as condições endógenas observadas em rainhas. No primeiro experimento, larvas de operárias do quarto (L4) e quinto instar inicial (L5F2) foram coletadas de favos e transferidos para um sistema de criação *in vitro*. No experimento, 3 grupos experimentais foram definidos. No primeiro grupo, larvas receberam uma aplicação tópica de 10 µg de HJ-III sintético em 2 µL de acetona. O segundo grupo recebeu quantidade igual de solvente e o terceiro grupo foi mantido como não tratado. Após 1, 6 e 24 horas, o corpo gorduroso dessas larvas foi dissecado para extração de RNA e síntese de cDNA para quantificação dos níveis de transcritos por RT-qPCR dos seguintes genes: *Kr-h1*, o gene de resposta imediata à HJ como controle da eficiência do tratamento, genes candidatos de dinâmica mitocondrial (*ERR*, *TOR*, *TFB2*, *FOXO*, *OPA1* e *FIS1*) e hipóxia (*Sima*, *Fatiga*). Para averiguar a influência do hormônio na eficiência mitocondrial, foi realizado experimento de respirometria de alta resolução, e avaliamos também a morfologia das mitocôndrias do corpo gorduroso por meio de microscopia eletrônica de transmissão. No segundo experimento os perfis de expressão gênica no corpo gorduroso de larvas L5F2 tratados ou não com HJ foi avaliada por RNA-seq seguido de análises de bioinformática para identificação de genes diferencialmente expressos. Referente ao experimento 1, apenas os genes *Estrogen-related receptor (ERR)* e *OPA1* apresentaram uma resposta imediata significativa ao

tratamento com HJ. Nas análises morfofisiológicas das mitocôndrias, as análises de respirometria de alta resolução não evidenciaram diferença no consumo de oxigênio como resposta direta ao HJ. No entanto, observou-se uma resposta ao HJ na morfologia das mitocôndrias, que sofriam modificações estruturais imediatas, mas logo retornavam ao normal, com o possível efeito de proteção mitocondrial da proteína OPA1. No segundo experimento, os resultados de RNA-seq mostraram diversos genes com resposta imediata ao HJ, entre estes, genes relacionados com a via de biossíntese do próprio hormônio, como também genes relacionadas à sinalização por ecdisona, metabolismo energético e diversas vias de sinalização de resposta a nutrientes. Também observamos uma ampla quantidade de transcritos diferencialmente expressos, para quais não há informações funcionais disponíveis. Concluimos, portanto, que, ao contrário da nossa hipótese, o HJ não age diretamente a nível fisiológico nas mitocôndrias, mas influencia consideravelmente o perfil transcricional do corpo gorduroso das larvas, dando pistas interessantes para futuras investigações.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Hormônio Juvenil. Atividade mitocondrial. Expressão gênica. Sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

SCHEFER, M. A. **The immediate response to juvenile hormone in the fat body of honey bee larvae.** 2019. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2019.

Caste differentiation in the honey bee *Apis mellifera* is regulated by the interaction of juvenile hormone (JH) with various signaling pathways involved in nutrient sensing (IIS, TOR and EGFR), as well as with the hypoxia response, associated with caste-specific mitochondrial changes in the fat body, which is the metabolic center of insects. Nonetheless, not much is known on how these factors are functionally connected. In this project we investigated the immediate transcriptional and physiological responses to JH in the fat body of worker larvae. The hypothesis was that a topical application of this hormone on worker larvae would mimic the endogenous conditions seen in queen larvae. In the first experiment, fourth (L4) and early fifth-instar (L5F2) worker larvae were taken from brood frames and transferred to an *in vitro* rearing system. The experiment consisted of 3 experimental groups. Those of the first group received a topical application of 10 µg of synthetic JH-III dissolved in 2 µL of acetone. The second group received an application of the same volume of the solvent, and the third group remained untreated. After 1, 6 and 24 hours the larval fat body was dissected for RNA extraction, cDNA synthesis, and RT-qPCR quantification of the transcript levels of the following genes: *Kr-h1*, the immediate response gene to JH as a control of the treatment efficiency, and candidate genes related to mitochondrial dynamics (*ERR*, *TOR*, *TFB2*, *FOXO*, *OPA1* and *FIS1*) and the hypoxia response (*Sima*, *Fatiga*). The analysis of mitochondrial efficiency was done by means of high resolution respirometry, and mitochondrial morphology was observed by electron transmission microscopy. In the second experiment we investigated the gene expression profiles in the fat body of L5F2 larvae, treated or not with JH by means of RNA-seq followed by a bioinformatics identification of the differentially expressed genes. With respect to experiment 1, we found that only the genes *Estrogen-related receptor (ERR)* and *OPA1* showed an immediate transcriptional response to JH. In the morphophysiological analysis of the mitochondria we found no difference for oxygen consumption between the groups.

However, we observed a rapid yet transient response to the JH treatment in mitochondrial morphology. After this change, the mitochondria soon returned to their normal morphology, and we think that the OPA1 protein may play a role in this mitochondrial stress response. In the second experiment, the RNA-seq results revealed various genes with a direct response to JH. Among these were genes involved in the biosynthesis of the hormone itself, as well as genes related to ecdysone signaling, energy metabolism, and different nutrient sensing pathways. We also noted a considerable proportion of differentially expressed genes for which no functional information is available. In conclusion, the results show that, JH does not act directly on the physiology of the mitochondria, contrary to our hypothesis, but that it considerably affects the transcriptional profile of the larval fat body, providing interesting clues for future investigations.

Keywords: *Apis mellifera*. Juvenile hormone. Mitochondrial activity. Gene expression. Next generation sequencing

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das fases larvais de acordo com o peso (MICHELETTE; SOARES, 1993).....	26
Tabela 2- Lista de primers utilizados para as análises de expressão gênica dos genes alvos.....	30
Tabela 3- Qualidade de alinhamento	58
Tabela 4- Lista de GDEs representando genes com genomicamente bem anotados. ..	66
Tabela 5- Lista de GDEs genomicamente não caracterizados como codificadores de proteína.	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Influências na determinação de castas.....	23
Figura 2 - Desenho experimental	27
Figura 3 - Modelo de gráfico de respirometria de alta resolução	33
Figura 4- Expressão relativa do gene Kr-h1 em larvas L4.....	38
Figura 5- Expressão relativa dos genes ERR, TFB2, OPA1 e FIS1 em larvas L4.....	39
Figura 6- Expressão relativa dos genes TOR e FoxO em larvas L4	40
Figura 7- Expressão relativa dos genes Fatiga e Sima em larvas L4.....	41
Figura 8- Expressão relativa do gene Kr-h1 em larvas L5F2.....	42
Figura 9- Expressão relativa dos genes ERR, TFB2, OPA1 e FIS1 em larvas L5F2.....	45
Figura 10- Expressão relativa dos genes TOR e FoxO em larvas L5F2	46
Figura 11- Expressão relativa dos genes Fatiga e Sima em larvas L5F2.....	47
Figura 12- Respirometria de alta resolução em larvas L5F2 após 1 hora de tratamento com HJ.	48
Figura 13- Respirometria de alta resolução em larvas L5F2 após 6 horas de tratamento com HJ.	49
Figura 14- Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de corpo gorduroso de larvas de rainha no estágio L5F2.	50
Figura 15- Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de larvas L5 após 1 hora de tratamento.	51
Figura 16- Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de larvas L5F2 após 6 horas de tratamento.....	52
Figura 17- Qualidade média das reads obtidas pelo sequenciamento.....	59
Figura 18- Heatmap da variância entre as amostras obtida pelo sequenciamento de RNA de larva L5F2 após 6 horas de tratamento com HJ.	60
Figura 19- Heatmap dos 40 genes com maior variância entre os grupos de tratamento. Larvas L5F2 após 6 horas de ação do HJ.....	62
Figura 20- Genes diferencialmente expressos entre contrastes dos grupos experimentais.....	64
Figura 21- Diagrama de Venn dos contrastes.	65
Figura 22- Representação esquemática da biossíntese de HJ em insetos.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Insetos altamente eussociais – divisão de trabalho e castas	16
1.2 Alimentação diferencial em abelhas melíferas	17
1.3 O hormônio juvenil	19
1.4 A integração das vias de sinalização sensorial de nutrientes, HJ e o metabolismo energético das larvas de <i>A. mellifera</i>	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. METODOLOGIA:	26
3.1 Coleta das larvas de <i>Apis mellifera</i>	26
3.2 Aplicação tópica de hormônio juvenil	27
3.3 Extração de RNA	28
3.4 Quantificação do RNA	28
3.5 Tratamento com DNase	28
3.6 RT-PCR	29
3.7 RT-qPCR em tempo real	29
3.8 Cálculo da expressão relativa	31
3.9 Microscopia Eletrônica	31
3.10 Análise do consumo de oxigênio	32
3.11 Sequenciamento de RNA	33
3.11.1 Preparação das amostras	33
3.11.2 Controle de qualidade e sequenciamento de RNA	34
3.11.3 Análise dos dados de RNA-Seq	34
CAPÍTULO I – Efeito do hormônio juvenil na expressão de genes candidatos e morfofisiologia mitocondrial	36
4. RESULTADOS	36
4.1 Expressão relativa de genes candidatos	36
4.1.1 Larvas L4	36
4.1.2 Larvas L5F2	42
4.2 Ensaio de Respirimetria de Alta Resolução	47
4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	49

5. DISCUSSÃO	53
5.1 – Larvas L4	53
5.2 Larvas L5F2	55
5.2.1 – Respirometria de Alta Resolução	56
5.2.2 – Microscopia Eletrônica de Transmissão	56
CAPITULO II - Efeitos do hormônio juvenil no perfil transcricional do corpo gorduroso – análises RNA-seq	58
6. RESULTADOS	58
6.1 Qualidade dos dados	58
6.2 Análise exploratória dos dados	59
6.3 Análise de expressão gênica diferencial	63
7. DISCUSSÃO	68
7.1 Perfis de expressão gênica	68
7.1.2 Biossíntese de HJ	68
7.1.3 Genes codificadores de enzimas	69
7.1.4 Componentes de membrana	70
7.1.5 Genes relacionados com a ligação de ácidos nucleicos	72
7.1.6 Genes relacionados com proteínas cuticulares	72
7.1.7 Genes tipo <i>Zinc-finger</i>	73
7.1.8 Genes relacionados ao desenvolvimento e função do intestino	74
7.1.9 Genes relacionados ao complexo de Golgi	75
7.1.10 Genes associados com microtúbulos	75
7.1.11 Genes não agrupados	76
7.1.12 Genes com pouca informação disponível	78
7.1.13 Genes não caracterizados	79
8. CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insetos altamente eussociais – divisão de trabalho e castas

Os insetos altamente eussociais são caracterizados por indivíduos adultos divididos em castas reprodutivas e não reprodutivas, que cuidam posteriormente dos indivíduos jovens (MICHENER, 1974; NOWAK; TARNITA; WILSON, 1971). Não diferente a outros himenópteros (vespas, abelhas e formigas), em *Apis mellifera*, o fenômeno de divisão do trabalho se dá unicamente entre indivíduos do sexo feminino: rainhas e operárias. As duas castas apresentam características morfofisiológicas altamente distintas; rainhas desempenham exclusivamente a função reprodutiva dentro da colônia, são indivíduos maiores que as operárias, com ovários desenvolvidos e alta expectativa de vida, ao passo que operárias desempenham todas as funções de manutenção da colônia, são menores e apresentam curto ciclo de vida adulta (WINSTON, 1987; NOWAK; TARNITA; WILSON, 1971). Entretanto, com poucas exceções (o gênero *Melipona* entre as abelhas sem ferrão e algumas espécies de formigas, por exemplo do gênero *Pogonomyrmex*), as duas castas no sexo feminino não apresentam genótipos distintos, e a sua divergência em termos fenotípicos se dá devido a fatores extrínsecos a quais são expostas durante as fases pré-imaginais, especialmente na fase larval quando alimentadas pelas operárias nutridoras da cria (HARTFELDER; EMLEN, 2012).

Essa especialização em tarefas realizadas no contexto social da colônia e o fato dos insetos sociais representarem até 30% da biomassa animal nos mais diversos ecossistemas terrestres (HÖLLDOBLER; WILSON, 2009) levaram a considerar os sistemas de organização nos insetos sociais como superorganismo (WHEELER, 1911; SEELEY, 1995; HÖLLDOBLER; WILSON, 2009; BOOMSMA; GAWNE, 2018)). Nesta teoria a colônia é considerada como um indivíduo único no qual as operárias representam a extensão somática e a rainha a reprodutiva. Entretanto, a aplicação do conceito de superorganismo para insetos sociais, é contestada no contexto da teoria de seleção por parentesco (RATNIEKS *et al.*, 2006; WENSELEERS, 2009). Apesar das diferenças na interpretação de insetos sociais como superorganismo ou guiada por seleção de parentesco entre os indivíduos, as duas perspectivas do funcionamento da colônia concordam que na evolução dos insetos sociais ocorreu uma quebra no paradigma do

trade-off entre reprodução e longevidade, que define de forma geral a vida dos metazoários. O paradigma do *trade-off* considera que nos organismos multicelulares há um balanço entre os recursos energéticos hora destinados a reprodução ou hora a manutenção do corpo somático, sendo que um aumento no investimento em reprodução necessariamente implicaria numa redução da longevidade do indivíduo adulto. Curiosamente, nos insetos altamente eussociais esse balanço parece quebrado, uma vez que as rainhas são altamente reprodutivas e longevas, enquanto as operárias não reproduzem ou possuem apenas taxas reprodutivas diminutas e ao mesmo tempo têm uma expectativa de vida curta.

A quebra deste paradigma tem sido atribuída às diferenças morfofisiológicas entre rainhas e operárias adultas. Estas diferenças são resultantes das condições às quais rainhas e operárias são expostas durante o desenvolvimento larval, quando recebem dietas diferentes. Assim, a definição das taxas de crescimento e fixação de tamanho dos indivíduos adultos está fortemente correlacionada com a atividade de vias de sensoriamento de nutrientes e as vias de sincronização das mudas pós-embrionárias de crescimento e metamorfose, especialmente a sinalização por fatores *insulina-like* (ILL) (WHEELER *et al.*, 2006; DE AZEVEDO; HARTFELDER, 2008), TOR (PATEL *et al.*, 2007) e a síntese e liberação de hormônio juvenil (HJ) nas *corpora allata* (RACHINSKY; HARTFELDER, 1990; RACHINSKY *et al.*, 1990). Em *A. mellifera*, estas vias de sinalização se mostraram importantes na diferenciação de castas rainha e operária (WHEELER *et al.*, 2006, 2014; PATEL *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2013; HARTFELDER *et al.*, 2015). Nos insetos em geral, estas vias também estão intimamente relacionados com o paradigma de *trade-off* entre reprodução e longevidade (FLATT, 2013).

1.2 Alimentação diferencial em abelhas melíferas

A diferenciação entre rainhas e operárias de *A. mellifera* se dá durante o desenvolvimento pós-embrionário sob influência de dietas distintas que larvas de rainhas e operárias recebem de operárias nutridoras adultas (SHUEL; DIXON, 1960). As diferenças nutricionais cruciais na determinação das castas diferem não só em termos quantitativos como também qualitativos (BEETSMA, 1979; WANG *et al.*, 2016). A princípio, larvas jovens recebem dietas semelhantes até o terceiro estágio larval,

entretanto, já deste o início a dieta das larvas (*worker jelly*) contém menos açúcares que a dieta das rainhas. Já a partir do quarto estágio larval, enquanto rainhas continuam ser alimentadas com altas quantidades de geleia real (GR), as operárias agora recebem uma dieta mista de secreção glandular, mel e pólen até o fim da fase de alimentação no quinto estágio larval.

A GR das rainhas e o alimento que as larvas operárias jovens recebem são secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares da cabeça (JUNG-HOFFMANN, 1966; DRAPEAU *et. al.*, 2006). Essas diferenças nos regimes alimentares podem, conseqüentemente, estimular diferencialmente as vias moleculares de sensoriamento de nutrientes (insulin-insulin-like, TOR e EGFR), bem como ativar paralelamente o sistema endócrino na produção de hormônios relacionados ao crescimento e mudas metamórficas, como o HJ e ecdisteroides (HARTFELDER; ENGELS, 1998; HARTFELDER *et al.*, 2015).

A hipótese do controle do processo de diferenciação de castas como consequência dos tipos de alimentação culminou no interesse da comunidade científica pela investigação dos fatores contidos em ambas dietas, principalmente em relação a composição da GR devido ao seu evidente poder de determinação das castas em *A. mellifera*. Em buscas de respostas, Kamakura (2011) publicou um artigo onde afirma que uma única proteína, Royalactina, encontrada na GR é a responsável pela diferenciação das larvas de abelhas melíferas em rainhas adultas. Essa proteína supostamente teria a capacidade de estimular o aumento do tamanho corporal e desenvolvimento dos ovários, assim como diminuir o tempo de desenvolvimento pós-metamorfose. No entanto, essas afirmações geraram repercussões no meio científico por atribuir a apenas uma proteína uma função tão complexa. Posteriormente, Buttstedt e colaboradores (2016) publicaram uma resposta onde demonstram experimentalmente que as Major Royal Jelly Proteins são os compostos principais de GR, mas não são determinantes para o desenvolvimento de rainhas, uma vez que tais compostos também estão presentes em concentrações similares na alimentação de larvas de operárias. Esta hipótese corrobora com a ideia já conhecida de que possivelmente o açúcar atua como um fago estimulante, e a sua maior concentração na GR assim, como o fato de ser servida às rainhas em grande quantidade, seriam os fatores primários da diferenciação.

1.3 O hormônio juvenil

Embora possua nítida importância e atuação marcante no metabolismo dos insetos, até pouco tempo pouco se conhecia sobre os detalhes do mecanismo de ação do HJ. Recentemente, suas vias de sinalização foram esclarecidos (para revisões ver JINDRA *et al.*, 2013; SHINODA, *et al.*, 2015; SANTOS; BELLES, 2018). Assim se esclareceu como o HJ exerce o seu importante rol de atuação na regulação de muda, metamorfose e na reprodução em grande parte dos insetos, sejam hemi ou holometábolos (SANTOS *et al.*, 2018), além de regular o polifenismo em insetos sociais como *A. mellifera*.

Quimicamente, o HJ é classificado como sesquiterpenoide e a sua produção ocorre em um par de glândulas retrocerebrais chamadas de *corpora allata*. Para o HJ existem variantes estruturais, como o JH-III, presente em todos os insetos, desde ametábolos até holometábolos. Pela sua importância como regulador de crescimento e reprodução de insetos, houve uma intensa busca para compostos sintéticos que mimetizam a ação de HJ, tais como o metopreno e pyriproxifeno, que, para sua ação, compartilham o mesmo receptor dos hormônios naturais (JINDRA *et al.*, 2007)

No que diz respeito ao mecanismo de ação de HJ há dois pontos cruciais, um sendo o receptor de HJ e ou outro a resposta molecular imediata (*read out*) da cascata de ativação no tecido exposto ao HJ. O receptor de HJ dos insetos, a proteína *Methoprene-tolerant* (Met), pertence à família bHelix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS), um conjunto de proteínas capazes de interagir especificamente com DNA. Met é hoje considerado como receptor específico do HJ capaz de transformar as repostas hormonais em processos de regulação gênica. A estreita relação entre o hormônio e o receptor foi demonstrada por Konopova e Jindra (2007) ao diminuírem os níveis de expressão genica de Met por meio de RNA de interferência (RNAi) em fases pós-embrionárias. Assim, obtiveram resultados fenotípicos semelhantes à ausência de HJ. Além disso, ao silenciar Met em larvas do besouro *Tribolium* no início do desenvolvimento, estas eram forçadas a entrar em metamorfose antes do período normal, produzindo pupas miniaturizadas. Enquanto isso, experimentos de RNAi de Met em fases finais do desenvolvimento larval dos besouros aceleravam o desenvolvimento de pupas e induziram características adultas incompletas. Esses resultados trazem à tona a evidência de atuação conjunta entre Met e HJ em sua atuação antimetamórfica.

Da mesma forma, a administração de HJ exógena em larvas na fase final do desenvolvimento tende a atrasar a metamorfose, podendo até apresentar uma fase larval “adicional” (KONOPOVA *et al.*, 2011). Estes experimentos levaram a afirmar que Met é o principal alvo de ligação do HJ nos insetos. (Para revisão, ver JINDRA *et al.* (2013).

A consequência imediata da ligação de HJ a Met é o aumento dos níveis transcricionais do gene *Krüppel-homolog 1 (Kr-h1)*. Este gene de resposta imediata é considerado como um repressor universal da metamorfose de insetos. Assim como nos experimentos envolvendo Met e HJ, o silenciamento da função de Kr-h1 induziu a metamorfose precoce de insetos em desenvolvimento, sejam hemi- ou holometábolos (KONOPOVA; SMYKAL; JINDRA, 2011). Para Kr-h1 notou-se uma estreita correlação entre a concentração de HJ presente na hemolinfa e os níveis de transcritos do gene (LOZANO; BELLES, 2011). Em última análise, Minakuchi *et al.* (2007) estabeleceram que, em *D. melanogaster*, o HJ previne a morfogênese adulta, atuando através do *Kr-h1* e outros genes conjuntamente como gene alvo da ligação de HJ ao receptor Met.

Por toda a evolução e diversificação dos insetos, Kr-h1 manteve a sua função regulatória, bem como a sua sequência de aminoácidos é muito bem conservada. Assim com as funções em morfogênese supracitadas para insetos, considera-se que o HJ e a sua via de sinalização (Met – Kr-h1) tem uma importante função também na determinação de castas em insetos sociais como *A. mellifera*.

Ao longo das décadas 60 e 70, muitos estudos foram realizados afim de encontrar o possível determinante de castas das abelhas melíferas. Especulava-se que a alimentação diferencial tivesse uma influência direta, assim como o balanço hormonal nas fases de desenvolvimento. Desta forma, após experimentos de Wirtz e Beetsma (1972; 1973) o HJ tornou-se um bom candidato a esta hipótese, já que observaram experimentalmente que a aplicação tópica desse composto artificial (JH III) induz o desenvolvimento de adultos com fenótipos mais similares com as rainhas, denominados “queen-like” em experimentos *in vivo*, posteriormente confirmados *in vitro* (REMBOLD; CZOPPELT; RAO, 1974). Seguindo os estudos na área, Rembold (1987) e Rachinsky *et al.* (1990) evidenciaram que larvas de rainha possuem maiores níveis de concentração de hormônio juvenil circulante na hemolinfa, sobretudo nas fases finais do

desenvolvimento larval quando contrastadas com as larvas de operárias, e maiores ainda quando comparadas às respectivas taxas de produção de HJ pelos *corpora allata* (REMBOLD, 1987). Estes resultados levaram a formulação de um modelo matemático que conectou as concentrações de açúcar no alimento larval (ASENCOT; LENSKY, 1984; ASENCOT; LENSKY, 1988), às concentrações de HJ na hemolinfa e as características morfológicas entre as duas castas de abelhas melíferas, principalmente o número de ovariolos nos ovários (LEIMAR *et al.*, 2011).

1.4 A integração das vias de sinalização sensorial de nutrientes, HJ e o metabolismo energético das larvas de *A. mellifera*.

A diferenciação das castas em abelhas melíferas envolve complexas vias de sinalização. Especialmente as vias de sinalização por insulina-insulin-like (IIS) e TOR estão intimamente ligadas a este processo atuando conjuntamente, mas não seguem o padrão esperado de outros organismos (HARTFELDER *et al.*, 2015). Ao contrário dos padrões observados para outros organismos, os níveis de expressão dos genes codificadores dos peptídeos insulina-like (ILPs) de *A. mellifera* se mostraram semelhantes em ambas as castas durante o seu desenvolvimento larval, enquanto a expressão dos genes codificadores dos receptores de insulina (InRs) diminuiu drasticamente em larvas de rainha ao adentrarem a fase de maior crescimento (DE AZEVEDO; HARTFELDER, 2008). Ademais, um estudo de silenciamento funcional de componentes da via IIS por meio de interferência de RNA indicou que os ILPs de *A. mellifera* podem atuar como reguladores da síntese de HJ nas *corpora allata* (Wang *et al.*, 2013). Já para a via TOR houve indicação de uma importante função na determinação do fenótipo de rainha, pois ao silenciar o gene *tor* por RNAi em larvas criadas em condições favoráveis ao desenvolvimento como rainhas, estas apresentaram o fenótipo de operária (PATEL *et al.*, 2007). O silenciamento desse gene também resultou na queda dos níveis de transcritos dos InRs, alterações nos níveis de expressão dos ILPs, e diminuição drástica nos títulos de HJ na hemolinfa (MUTTI *et al.*, 2011), indicando assim uma estreita relação entre as vias TOR e IIS e os níveis de HJ circulante. No entanto, análises dos níveis de expressão do gene *tor* mostraram que, contrário do que se esperava, o mesmo é mais expresso em larvas de operárias do que em rainhas (HARTFELDER *et al.*, 2015).

Similarmente, o gene codificador do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), proposto como ativado em rainhas por um fator da GR (Kamakura, 2011), também apresentou uma contradição ao esperado, mostrando-se mais expresso em larvas operárias do que em rainhas (HARTFELDER *et al.*, 2015).

Essas aparentes relações contraditórias entre as vias IIS, TOR, EGFR e o desenvolvimento das castas trouxeram à atenção a via de sinalização de hipóxia, que não só apresenta uma interação com a sinalização IIS/TOR como também pode afetar o crescimento e desenvolvimento larval em *Drosophila melanogaster* (Dekanty *et al.*, 2005). Interessantemente, em larvas de *A. mellifera*, os três genes centrais da resposta, *AmSima* (ortólogo de HIF α), *AmTango* (ortólogo de HIF β) e *AmFatiga* (ortólogo de PHD) se mostraram mais expressos em larvas operárias, indicando uma resposta tipo hipóxia endógena, uma vez que na colmeia as larvas de rainhas e operárias são criadas em condições ambientais iguais, sendo improvável uma diferença considerável de concentração de O₂ externo (AZEVEDO *et al.*, 2011). Tal relação entre a expressão diferencial dos genes centrais da resposta à hipóxia e o desenvolvimento das castas em *A. mellifera*, de fato, remete a resultados de estudos realizados há décadas que evidenciaram diferenças marcantes no conteúdo de mitocôndrias e consumo de oxigênio em larvas de rainhas e operárias.

Estas diferenças demonstram, por exemplo, que as larvas de rainha possuem altos níveis de consumo de oxigênio, refletidas nas taxas respiratórias e níveis de citocromo c (OSANAI; REMBOLD, 1968; EDER *et al.*, 1983). Tais achados tornaram o corpo gorduroso um órgão alvo para estudos destas questões, uma vez que pode ser considerado o centro do metabolismo intermediário dos insetos e funcionalmente homólogo ao fígado e tecido adiposo dos vertebrados. Ao analisar o número e a distribuição subcelular das mitocôndrias nos trofócitos do corpo gorduroso, assim como a capacidade de respiração oxidativa e respectivamente produção de ATP por meio de respirometria de alta resolução, notou-se que nas larvas de rainha há um número de mitocôndrias consideravelmente maior nesse órgão, e que esse aumento é correlacionado com maiores níveis de expressão de genes envolvidos na mitogênese (SANTOS *et al.*, 2016). Essa diferença no conteúdo mitocondrial reflete na maior capacidade de produzir ATP, associada a uma demanda energética menor quando

comparada às operárias (SANTOS *et al.*, , 2016). Assim estabeleceu-se uma rede de evidências que conectam o estímulo nutricional com vias de sinalização e o metabolismo energético no processo da diferenciação das castas em abelhas melíferas. Entretanto, faltou ainda esclarecer em termos funcionais a relação causa/consequência entre o sistema endócrino, especialmente HJ, as vias de sinalização de nutrientes, e a dinâmica mitocondrial, respectivamente, à regulação metabólica.

Em conclusão, estabeleceu-se ao longo das décadas uma rede de evidências que conectam o estímulo nutricional com as vias de sinalização e o metabolismo energético no processo da diferenciação das castas em abelhas melíferas (Fig. 1).

Figura 1 – Influências na determinação de castas

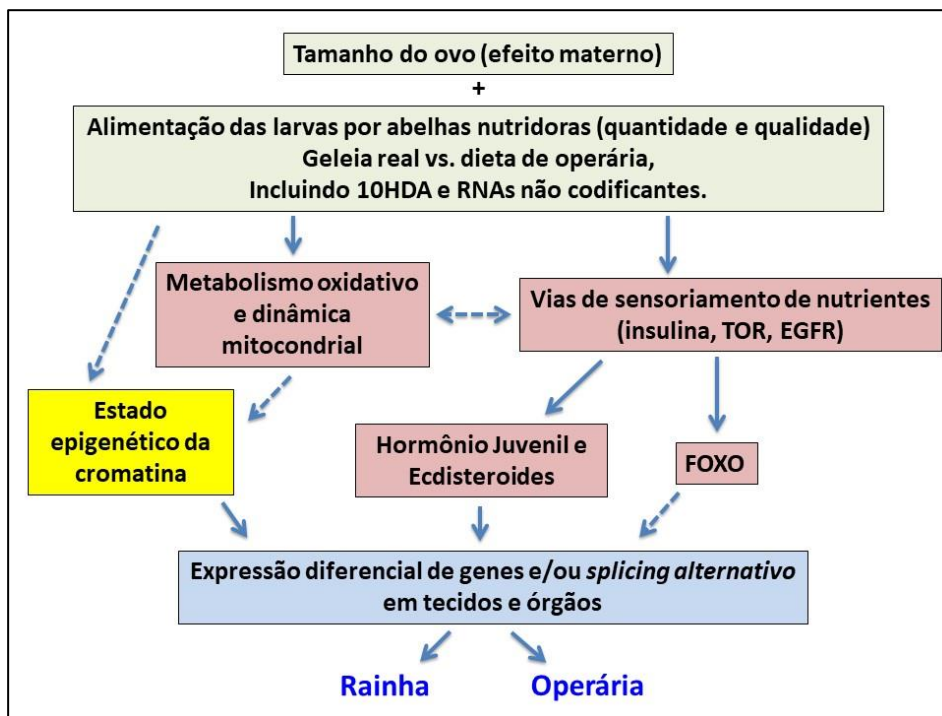


Figura 1- Modelo esquemático dos fatores que influenciam na diferenciação de castas em *A. mellifera* (CERVONI; HARTFELDER, 2019).

Entretanto, falta ainda esclarecer em termos funcionais a relação causa/consequência entre o sistema endócrino, especialmente HJ, as vias de sinalização de nutrientes, e a dinâmica mitocondrial, respectivamente à regulação metabólica.

A nossa hipótese é que a produção de HJ, supostamente regulado pelas vias IIS/TOR e EGFR, promoveria a mitogênese no corpo gorduroso e assim levaria a um aumento das taxas metabólicas nas larvas de rainhas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi averiguar a relação entre a sinalização por HJ, dinâmica mitocondrial e atividade de genes de sensoriamento de nutrientes (IIS/TOR e EGFR) em larvas de operárias de *A. mellifera* em sistema de criação *in vitro* de larvas.

2.2 Objetivos Específicos

- 1.** Criar *in vitro* larvas em dieta definida, assim eliminando o fator da alimentação não controlável das larvas pelas operárias nutridoras e evitando a remoção de larvas tratadas com HJ;
- 2.** analisar a expressão de genes das vias de sensoriamento de nutrientes, de hipóxia e de mitogênese no corpo gorduroso das larvas tratadas e controles por meio de PCR em tempo real;
- 3.** analisar a capacidade respiratória e consumo de oxigênio das mitocôndrias estimuladas por HJ por meio de respirometria de alta resolução;
- 4.** avaliar as diferenças morfológicas das mitocôndrias estimuladas por HJ através de microscopia eletrônica de transmissão;
- 5.** realizar experimento para sequenciamento de transcriptomas do corpo gorduroso de larvas do quinto instar larval após 6 horas de exposição ao HJ;
- 6.** analisar os transcriptomas obtidos pelo sequenciamento Illumina para identificação de genes diferencialmente expressos.

3. METODOLOGIA:

3.1 Coleta das larvas de *Apis mellifera*

As larvas foram coletadas do apiário da Universidade de São Paulo no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no quarto e quinto instar larval, obedecendo os critérios classificatórios segundo o peso já descritos em literatura (**Tabela 1**) (MICHELETTE; SOARES, 1993). Essas fases foram escolhidas por se tratarem do momento do desenvolvimento pós-embrionário onde o comprometimento diferencial da larva para ser uma rainha ou operária ainda não está definido, já que nosso foco é entender melhor os mecanismos de diferenciação das castas a partir da influência do HJ. Já para as análises do metabolismo oxidativo, escolhemos larvas do início do quinto instar, uma vez que nesta fase foram detectadas as maiores diferenças entre rainhas e operárias (Santos *et al*, 2016). É importante salientar também que após essa fase, a larva entra no estágio de tecelagem de casulo (*cocoon spinning*), sendo este o momento quando a casta já está totalmente determinada.

As larvas foram coletadas diretamente dos favos de cria e transferidas para placas com cúpulas de criação *in vitro* contendo 80 µL de alimento artificial, preparado com dieta conhecida específica para operárias, contendo 6% de frutose, 6% de glicose, 1% de extrato de levedura, 50% de geleia real comercial e água autoclavada, segundo o protocolo de criação *in vitro* do COLOSS BEEBOOK (CRAILSHEIM *et al.*, 2013). As placas foram incubadas em ambiente controlado a 34.5 °C e 60% de umidade relativa.

Tabela 1- Classificação das fases larvais de acordo com o peso (MICHELETTE; SOARES, 1993)

Instar	Estágio específico		Rainha	Operária
			Peso (mg)	
L4			3,8-44	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
L5	Fase de tecelagem de casulo (<i>spinning phase</i>)	Característica intestinal		
		S1	Intestino Cheio	
		S2	Intestino metade cheio e metade vazio	
		S3	Intestino vazio	

3.2 Aplicação tópica de hormônio juvenil

O HJ foi administrado utilizando uma micropipeta para aplicação tópica diretamente na cutícula da larva na concentração de 10µg diluído em 2µL de acetona. A dose utilizada já é descrita na literatura como adequada para proporcionar a diferenciação em rainhas (WIRTZ, ; BEETSMA, 1972; REMBOLD; CZOPPELT; RAO, 1974). Para cada grupo experimental foram criados dois grupos controle, sendo um livre de tratamento (NT) e outro com administração de solvente (AC) em mesmo volume do grupo teste, cada grupo contendo 5 replicatas biológicas (n = 5).

Os ensaios experimentais foram realizados nos intervalos de 1, 6 e 24 horas após o tratamento, tanto para larvas do quarto, quanto do quinto instar larval (**Fig. 2**). Dessa forma, foi possível analisar a dinâmica da resposta ao tratamento com HJ. Imediatamente após a coleta, as larvas foram dissecadas com pinças sob um estereomicroscópio para retirada de tecido do corpo gorduroso, uma vez que este órgão constitui o centro metabólico dos insetos.

Figura 2 - Desenho experimental

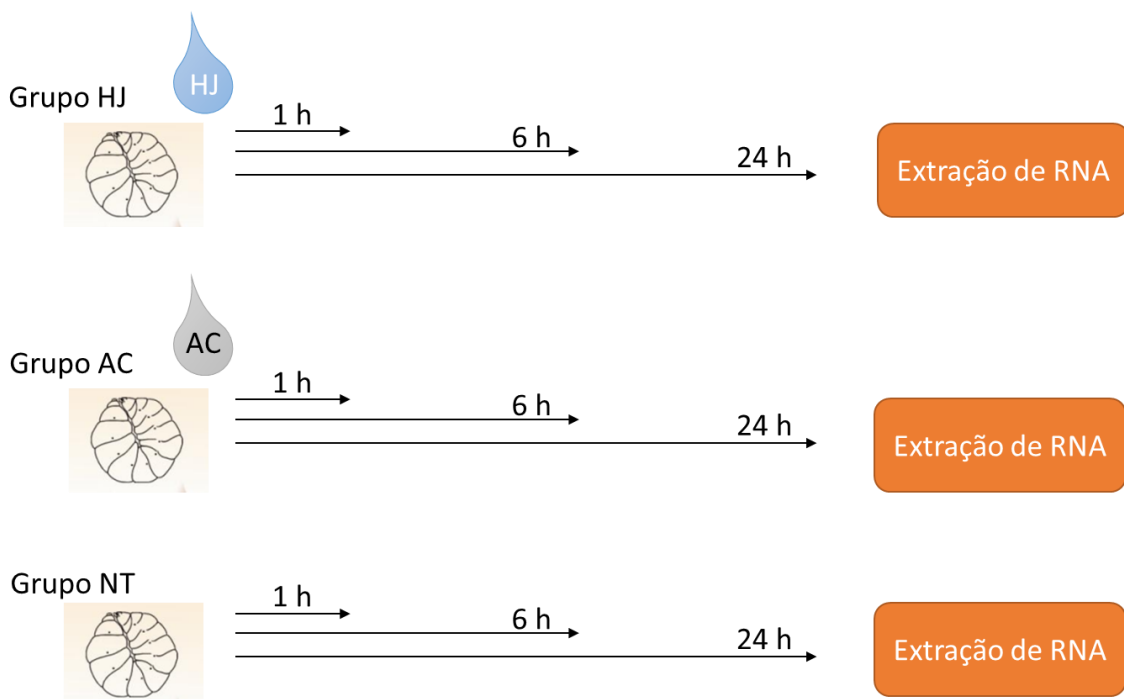


Figura 2: Representação do desenho experimental utilizado no trabalho. Aqui é demonstrado o grupo experimental (HJ) e seus dois grupos controle, um tratado com solvente (AC) e outro livre de tratamento (NT). Após 1, 6 e 24 horas, as amostras eram encaminhadas para os procedimentos para extração de RNA.

3.3 Extração de RNA

Os tecidos de corpo gorduroso dissecados foram colocados em tubos contendo 500 μL de TRIzol® (Invitrogen) e guardados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração do RNA total. As amostras foram homogeneizadas e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 200 μL de clorofórmio, seguido de agitação rigorosa por 15 segundos e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a $12.000 \times g$ a 4°C por 15 minutos, retirou-se então o sobrenadante contendo o RNA (fase aquosa). Essa etapa foi repetida adicionando-se 500 μL de clorofórmio. A fase aquosa foi coletada e o RNA precipitado em 300 μL de álcool isopropílico. Em seguida, o material foi colocado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a $12.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. O precipitado de RNA foi lavado em 500 μL de etanol 75% e ressuscitado, seguido por centrifugação a $7500 \times g$ a 4°C por 5 minutos. Após a precipitação final do RNA e a remoção do etanol, o material foi completamente seco usando um termobloco a 55°C , e ao final foi ressuscitado em água tratada com DEPC para estocagem à -80°C .

3.4 Quantificação do RNA

A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria em sistema NanoVue (GE Healthcare). A leitura foi feita usando um comprimento de onda de 260 nm. Nesse comprimento de onda considera-se que uma unidade de absorbância corresponde a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA. A pureza da amostra é analisada pela razão da leitura 260/280 nm que deve ser superior a 1,8.

3.5 Tratamento com DNase

O RNA total obtido foi tratado com DNase livre de RNase (Invitrogen), com o propósito de eliminar resquícios de DNA genômico. Para cada 3 μg de RNA total foi adicionado 0,5 μL de DNase diluída (correspondente a 0,1 U). A digestão foi realizada durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em seguida foi adicionado 1 μL de EDTA 50 mM por 10 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ para inativar a reação. O produto final foi utilizado como molde para transcrição reversa.

3.6 RT-PCR

A primeira fita de cDNA foi sintetizada com 3 µg de RNA total, utilizando o sistema de transcrição reversa SuperScript II® (Invitrogen) e *primer* oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen). Foi adicionado 1 µL de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/µL) 1 µL de dNTPmix (10 mM) (Invitrogen) e H₂O DEPC em quantidade para completar 12 µL do volume de reação, que foi mantida por 5 minutos a 65 °C. O próximo passo foi adicionar 4 µL de 5x First Strand Buffer® (Invitrogen), 2 µL de ditioneitol (DTT, 0,1 M) (Invitrogen) e 1 µL de RNaseOUT® (40 U/µL) (Invitrogen). A reação foi mantida por 2 minutos a 42 °C. Por fim, foi adicionado 1 µL de enzima SuperScript II e a reação de síntese da primeira fita de cDNA realizada por 50 minutos a 42 °C. A reação foi terminada com desnaturação da enzima a 70 °C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20 °C até uso nos ensaios para quantificação dos transcritos por RT-PCR convencional e em tempo real (RT-qPCR).

As análises por PCR convencional foram realizadas utilizando 1 µL de amostra de cDNA diluído 10x para amplificar os respectivos fragmentos gênicos utilizando 10 µL de Master Mix (Fermentas) em volume final de 20 µL. O controle negativo foi realizado sem adicionar cDNA. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR convencional foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1% ou 1,5%) em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA). O marcador usado foi GeneRuler 100 bp DNA Ladder® (Fermentas) e as amostras foram coradas por inclusão do corante BlueGreen® (LGC Biotecnologia) com o tampão carreador.

3.7 RT-qPCR em tempo real

Para as reações de amplificação por PCR em tempo real foram utilizados *primers* específicos de *Apis mellifera* para o gene de resposta imediata ao hormônio juvenil *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*, *target-of-rapamycin (TOR)*, bem como o gene relacionado a biogênese mitocondrial *Estrogen-related Receptor (ERR)*, *Forkhead box O (FOXO)*, o gene responsivo a hipóxia ortólogo ao HIF1β (*Sima*), e os genes controladores de fusão e

fissão mitocondrial *Mitochondrial Dynamin-like GTPase 1 (Opa1)* e *Mitochondrial Fission Protein 1 (Fis1)*, respectivamente (**Tabela 2**).

A metodologia empregada nos ensaios de RT-qPCR foi do *SYBR Green* e a reação ocorreu no sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para montagem das reações utilizou-se 7,5 µL de *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix™* (Fermentas), 1 µL de cada um dos respectivos *primers forward (F)* e *reverse(R)* (diluídos a 10 pM), 1 µL de cDNA e 3,5 µL de água estéril, totalizando um volume final de 13 µL por reação. As reações ocorreram nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A curva de dissociação para verificação da especificidade do produto foi gerada ao final do último ciclo, aquecendo a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 15 segundos. As reações foram realizadas em quintuplicatas biológicas (n=5), cada uma dessas sendo analisada em triplicata técnica (n=3).

Tabela 2- Lista de primers utilizados para as análises de expressão gênica dos genes alvos

Nome do Gene	BeeBase	GenBank	Sequência do primer
<i>Kr-h1</i>	GB45427 XR_003304765.1		F: 5'- GCACTGGCAGTGACAAGGAA -3' R: 5'- CGTGGAGTGTTATCGTAAGTAGCAA -3'
<i>TOR</i>	Patel <i>et. al</i> , 2007		F: 5'- GTTGGAGGTGTGAATACTCC -3' R: 5'- CCAGATACTCCCATTCTCTAC -3'
<i>FoxO</i>	Wheeler <i>et. al</i> , 2007		F: 5'- TTATGCGAGTGCAGAACGAG -3' R: 5'- AACCGGACTGTCTGGAAAGA -3'
<i>Sima</i>	Azevedo <i>et al</i> , 2011		F: 5'-TGAACGACAGCATGAACGACAGCATGGCCGA-3' R:5'-CGTTCGTTGCTCCTTCTCCG- 3'
<i>ERR</i>	Santos <i>et al</i> , 2016		F: 5'-CTTTGCCTAGTCTGCGGTGA-3' R:5'-ATCTCACACTCCCCATTCGC-3'
<i>TFB2</i>	Santos <i>et al</i> , 2016		F: 5'-TCAATTTTTGGCATTTTATTCGACA-3' R:5'-CACATCCAGGAAGTACTTTTTCCA-3
<i>OPA1</i>	GB52849	XM_016913659.1	F: 5'-TCCTCTAATCGTATATTTGACGCA- 3' R: 5'-ATCGGCTAATGGTCGTGCAA -3'

<i>FIS1</i>	GB46314	XM_623 646.5	F: 5'- GCTTTAGCGTATGTCAGATCGT-3' R: 5'- ACCATAAAGTCCCTCTTTTCCA-3'
<i>rp49</i>	Lourenço et al., 2008		F: 5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3' R: 5'-TTGAGCACGTTCAACAATGG-3'

3.8 Cálculo da expressão relativa

A abundância dos transcritos foi calculada em relação aos valores Ct (*threshold cycle*) do gene alvo e do gene de controle endógeno *rp132* (Lourenço *et al.*, 2008) e utilizando um indivíduo do grupo controle como referência normalizadora interna. Os valores da expressão relativa foram calculados seguindo metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e as diferenças entre os grupos foram analisadas através de teste estatístico One-way ANOVA com correção de Bonferroni utilizando o software estatístico GraphPad Prism V5.0 (Jandel Scientific) para análise e plotagem dos gráficos.

3.9 Microscopia eletrônica

O tecido de corpo gorduroso proveniente de 3 indivíduos de cada grupo foi dissecado e transferido para solução fixadora (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,1, contendo sacarose 0,3 M para controle osmótico). A fixação ocorreu em 2 horas em temperatura ambiente. A pós-fixação foi realizada por tetróxido de ósmio 2%, seguido da desidratação das amostras em série de crescente de etanol (70% a 100%). Por final, as amostras foram embebidas em resina Araldite 506 epoxy (A3183 Sigma) e deixadas para polimerizar. Cortes ultrafinos de 80-90 nm foram obtidos em ultramicrotomo (Leica) e transferidas para grades de cobre. A contrastação dos cortes foi realizada com acetato de uranila (1%) e citrato de chumbo, e os cortes foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-100 CXII). As imagens digitais captadas foram processadas para ajuste de brilho e contraste no software ImageJ®.

3.10 Análise do consumo de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio das células do corpo gorduroso foi medida por meio da técnica de respirometria de alta resolução. Neste procedimento, o tecido em questão é posto na câmara de reação de um oxígrafo contendo meio de respiração sob agitação constante. Sensores presentes na câmara captam a concentração de oxigênio na câmara, assim possibilitando observar o seu consumo em função do tempo. O consumo de oxigênio basal e o comportamento das mitocôndrias frente à administração de reagentes modulatórios (succinato, ADP, oligomicina, CCCP e antimicina) dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, assim pode ser registrado e medido por software próprio do oxígrafo.

Os ensaios foram realizados em temperatura controlada de 37 °C, utilizando o aparelho Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) e aquisição dos dados utilizando o software DatLab, do próprio fabricante (Oroboros), configurado para registro do consumo de oxigênio em intervalos de 2 segundos.

O corpo gorduroso de operárias do quinto instar larval em estágio de alimentação (L5F2) (n=5) utilizado nestes experimentos foi dissecado após 1 e 6 horas de tratamento das larvas com hormônio juvenil e imediatamente transferido para a câmara do oxígrafo contendo 2,1 mL de meio de respiração MiR05 (EGTA 0,5 mM, MgCl₂.6H₂O 3mM, ácido L-lactobiônico 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D-sacarose 110 mM, BSA 1g/L). Na câmara de reação, o tecido foi mantido sob agitação constante.

Primeiramente foi registrado o consumo basal (*Routine*, R) de oxigênio, que permite inferir a atividade endógena normal do tecido, sem que haja nenhuma modulação da mitocôndria ou alteração em sua atividade. Em seguida, adiciona-se succinato 10mM, este considerado um fator limitante da respiração celular por se tratar do precursor do fumarato. Em seguida, é adicionado ADP 220 μM, também um importante fator limitante por se tratar de um precursor na produção de ATP mitocondrial. Adiciona-se, então, oligomicina (1 μg/mL), um inibidor temporário da ATP sintase, causando vazamento de elétrons através da membrana mitocondrial interna em estado não fosforilante (*Leak*). Por fim, adicionam-se doses sequenciais do protonóforo carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP, 1 μM), afim de determinar o estado da capacidade máxima do sistema de transporte de elétrons (ETS, *electron transport*

system) através do desacoplamento mitocondrial. A CCCP permite que os prótons localizados no espaço intermembrana passem pela membrana interna da organela, estimulando o consumo máximo de oxigênio afim de reconstituir o gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP (**Figura 3**). Nesses experimentos, os resultados do grupo de abelhas tratadas com HJ foram comparados aos de larvas do grupo controle tratadas com solvente.

Figura 3 - Modelo de gráfico de respirometria de alta resolução

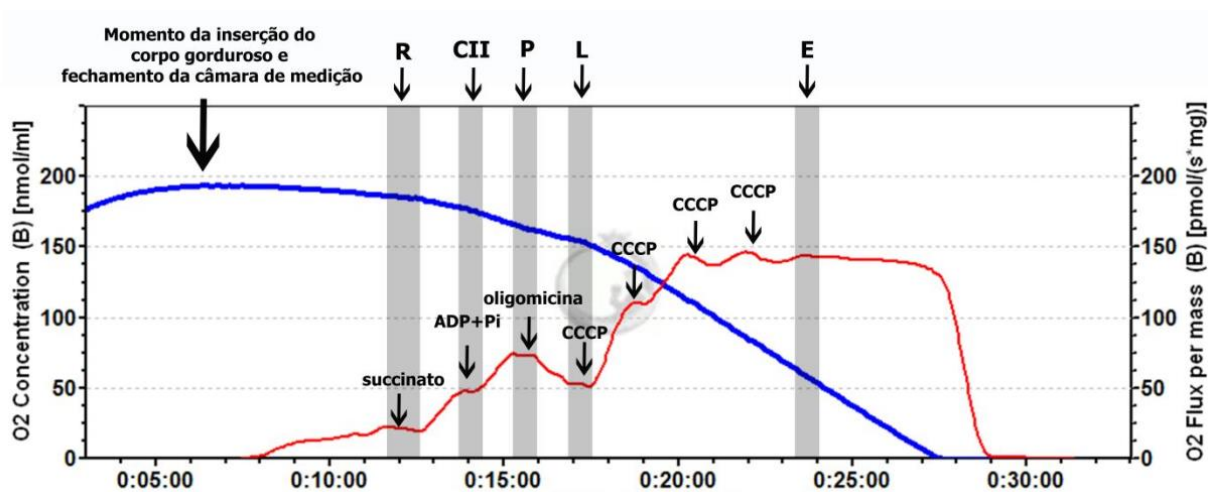


Figura 3: Gráfico exemplar de um experimento de respirometria de alta resolução gerado pelo aparelho Oxygraph-2k (Oroboros Instruments). Ao colocar o tecido, a câmara do aparelho é fechada e inicia-se o sensoriamento de Oxigênio presente no sistema e conseqüentemente o seu consumo. O experimento se inicia a partir do estado mitocondrial basal (R) quando se atinge o primeiro platô, onde a partir daí segue-se uma seqüência de adição de substâncias moduladoras mitocondriais a cada novo platô gerado (setas). A curva em azul indica a concentração de oxigênio presente na câmara e a curva vermelha representa o fluxo de Oxigênio consumido pelo tecido. Os platôs são designados de acordo com o estado da mitocôndria, sendo basal (R), ligação com o complexo II (CII), fosforilação (P), vazamento de elétrons (L) e a capacidade máxima de transporte (ETS). Os dados coletados foram utilizados para o cálculo do acoplamento mitocondrial (razão entre L e ETS), fosforilação de desacoplamento (razão entre L e P), demanda fisiológica (R/ETS) e outras razões como respiração basal e fosforilação, relação CII/ETS e CII/P (Santos, et. al., 2016).

3.11 Sequenciamento de RNA

3.11.1 Preparação das amostras

O objetivo desta etapa foi de comparar os perfis de expressão gênica de forma geral entre larvas de *A. mellifera* tratadas ou não com HJ. Para tal, o experimento foi conduzido contendo 3 indivíduos na fase larval L5F2 por amostra em cada grupo

experimental (n=3), tratadas com HJ (HJ), acetona (AC) ou como grupo controle não tratado (NT) por 6 horas, conforme descrito no ponto 3.2. Após dissecação do corpo gorduroso, o RNA foi extraído como descrito previamente no ponto 3.3. Utilizando 3 indivíduos por é possível se estabelecer um *pool* mais rico e com maior confiabilidade da variabilidade existente dentro da colônia.

3.11.2 Controle de qualidade e sequenciamento de RNA

As amostras preparadas de RNA total foram diluídas a de 75 ng/μL de RNA e enviadas para o Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Através do sistema 2100 Bioanalyzer, as amostras foram submetidas ao controle de qualidade, fornecendo informações sobre a integridade do material, gerando tabelas de resultados e imagem (*gel-like*) de eletroforese virtual, mostrando os fragmentos presentes na amostra com seus respectivos tamanhos e quantificação relativa dos picos de cada fragmento. Caso atinjam a qualidade mínima exigida (80% de integridade), as amostras passam para o sequenciamento propriamente dito, utilizando o sistema HiSeq 2500® (Illumina) que possui notável capacidade de processar um grande número de amostras e gerar uma grande quantidade de dados para análise bioinformática.

3.11.3 Análise dos dados de RNA-Seq

Primeiramente, cada uma das bibliotecas geradas por sequenciamento (*paired end* 150bp) foi submetida ao controle de qualidade utilizando o pacote Rqc, disponível no repositório Bioconductor (HUBER *et al.*, 2015). Os dados foram processados utilizando o *pipeline frtc* (<https://github.com/alanlorenzetti/frtc>) (TEN-CATEN *et al.*, 2018) com alteração de alguns parâmetros.

Em resumo, as bibliotecas passaram pelo processo de (i) *trimming*, no qual a ferramenta Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) faz a remoção de adaptadores e de extremidades de baixa qualidade; (ii) alinhamento ao genoma de referência, no qual a ferramenta HISAT2 (KIM; LANGMEAD; SALZBERG, 2015) mapeia as *reads* ao genoma de referência (NCBI Assembly Amel_HAv3.1; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_003254395.2) permitindo *splicing*, *soft-clipping* e *gaps*; (iii) preparação dos arquivos de alinhamento, no qual se emprega a

ferramenta SAMtools (LI *et al.*, 2009) e algumas rotinas personalizadas para a manutenção apenas das *reads* unicamente alinhadas, ou seja, aquelas que não se alinham a mais de uma região do genoma.

Foi elaborada uma matriz de contagem com o número de *reads* alinhadas em cada um dos *loci* anotados. Para isto, utilizou-se o pacote GenomicAlignments (LAWRENCE *et al.*, 2013), tendo como *input* os alinhamentos gerados para cada biblioteca e a anotação gênica disponível na RefSeq do NCBI para o genoma de referência de *A. mellifera*. A matriz de contagem foi utilizada como *input* no *software* DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), o qual realizou a análise de expressão diferencial considerando os contrastes HJ vs. NT e AC vs. NT. Foram classificados como diferencialmente expressos aqueles genes que satisfizeram os limiares $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$ e valor-*p* ajustado $< 0,01$.

Por fim, os genes diferencialmente expressos passaram pelo processo de categorização funcional, no qual (i) o produto dos genes foi herdado da anotação gênica; (ii) a via metabólica, obtida do KEGG *Pathway* (KANEHISA *et al.*, 2017); (iii) e os termos do *Gene Ontology* (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2019), obtidos diretamente do banco de dados UniProt (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). As informações foram adquiridas com auxílio dos pacotes KEGGREST e Uniprot.ws, ambos disponíveis no pacote Bioconductor(<https://www.bioconductor.org/>).

CAPÍTULO I – Efeito do hormônio juvenil na expressão de genes

candidatos e morfofisiologia mitocondrial

4.RESULTADOS

4.1 Expressão relativa de genes candidatos

4.1.1 Larvas L4

Larvas do quarto instar (L4) de *A. mellifera* foram submetidas à aplicação tópica de HJ em sistema criação *in vitro* a fim de mimetizar os títulos endógenos de HJ elevados em larvas de rainha, já que tal tratamento tipicamente induz o desenvolvimento deste fenótipo. O objetivo específico foi estudar o efeito direto do HJ sobre o metabolismo oxidativo na fase larval que diretamente precede a do quinto instar, no qual a casta já está determinada. Assim, o quarto instar ainda apresenta certa flexibilidade no que diz respeito ao comprometimento da casta. Primeiramente, para validar a eficiência do tratamento foram avaliados os níveis de expressão do gene *Krüppel homolog-1 (Kr-h1)*, gene de resposta imediata ao HJ (JINDRA *et al.*, 2013). As respostas foram analisadas respectivamente após 1, 6 e 24 horas de tratamento (**Fig. 4**).

Os resultados indicam que a expressão de *Kr-h1* ocorre imediatamente após o tratamento com HJ, podendo ser identificado já 1 hora depois da aplicação do hormônio sintético (**Fig. 4A**). Este resultado corrobora com a hipótese que *Kr-h1* se caracteriza como um gene codificador de um fator de transcrição de resposta imediata da ação transcricional do HJ e ao mesmo tempo atesta a eficácia de nosso desenho experimental. Curiosamente, verificou-se uma intensa queda dos níveis de expressão de *Kr-h1* já logo após 6 horas de tratamento, mantendo-se relativamente estável em níveis baixos até as 24 horas (**Fig. 4D**).

Após a validação da eficácia do tratamento, avaliamos a possível ação do HJ sobre o metabolismo larval. Para tal, foram analisados os níveis de expressão relativa de três conjuntos de genes pertencentes a diferentes funcionalidades intracelulares. O primeiro grupo foi composto por genes relacionados à mitogênese (*ERR* e *TFB2*) e ao processo de fissão e fusão mitocondrial (*FIS1* e *OPA1*) respectivamente (**Fig. 5**). Já o segundo grupo é relacionado a vias de controle de sinalização do crescimento, sendo

estes *TOR* e *FoxO* (**Fig. 6**). Por fim, o último grupo era constituído por genes relacionados à resposta hipóxica, *Sima* e *Fatiga* (**Fig. 7**).

Ao analisarmos o perfil de expressão de genes relacionados à dinâmica mitocondrial em larvas L4, notamos que o HJ não promoveu alteração na expressão do principal fator de transcrição responsável pela biogênese mitocondrial, *TFB2*, e nem do fator de fusão mitondrial *OPA1* durante o período de 24 horas após aplicação do HJ (**Fig. 4B-4C**). No entanto, os níveis de expressão dos genes *ERR* e *FIS1* apresentaram comportamentos distintos dos genes anteriores. A princípio, nossos resultados demonstram que o tratamento com HJ exógeno resultou na diminuição da expressão de *ERR* durante a fase da resposta imediata (1 h), normalizando ao longo do tempo de ação do tratamento de 6 h e 24 h (**Fig. 6A**). Diferentemente, as alterações significativas na expressão do gene *FIS 1* aparecem apenas no fim do intervalo de 24 horas após tratamento quando comparados os grupos HJ e NT. Entretanto, não houve diferença estatística entre os grupos controle ou entre NT e AC, indicando um possível efeito do solvente (acetona) na resposta.

A segunda frente de análises levou em consideração os níveis de expressão dos genes *TOR* e *FoxO*. A partir dos resultados é possível notar uma diminuição na expressão relativa do gene *TOR* às 24 horas no grupo HJ em relação ao grupo NT (**Fig. 7A**). No entanto, esta resposta é acompanhada também pelo grupo ACE, indicando novamente uma influência do solvente, e não representando de fato um efeito específico do tratamento hormonal. Já em relação ao gene *FoxO*, não houve influência significativa do HJ na sua expressão.

Por fim, o estudo da influência de HJ sobre genes da resposta hipóxica, *Fatiga* e *Sima*, também não mostrou um efeito significativo, levando-nos a concluir que o HJ não possui ação direta sobre esta via na fase larval estudada.

Figura 4- Expressão relativa do gene *Kr-h1* em larvas L4

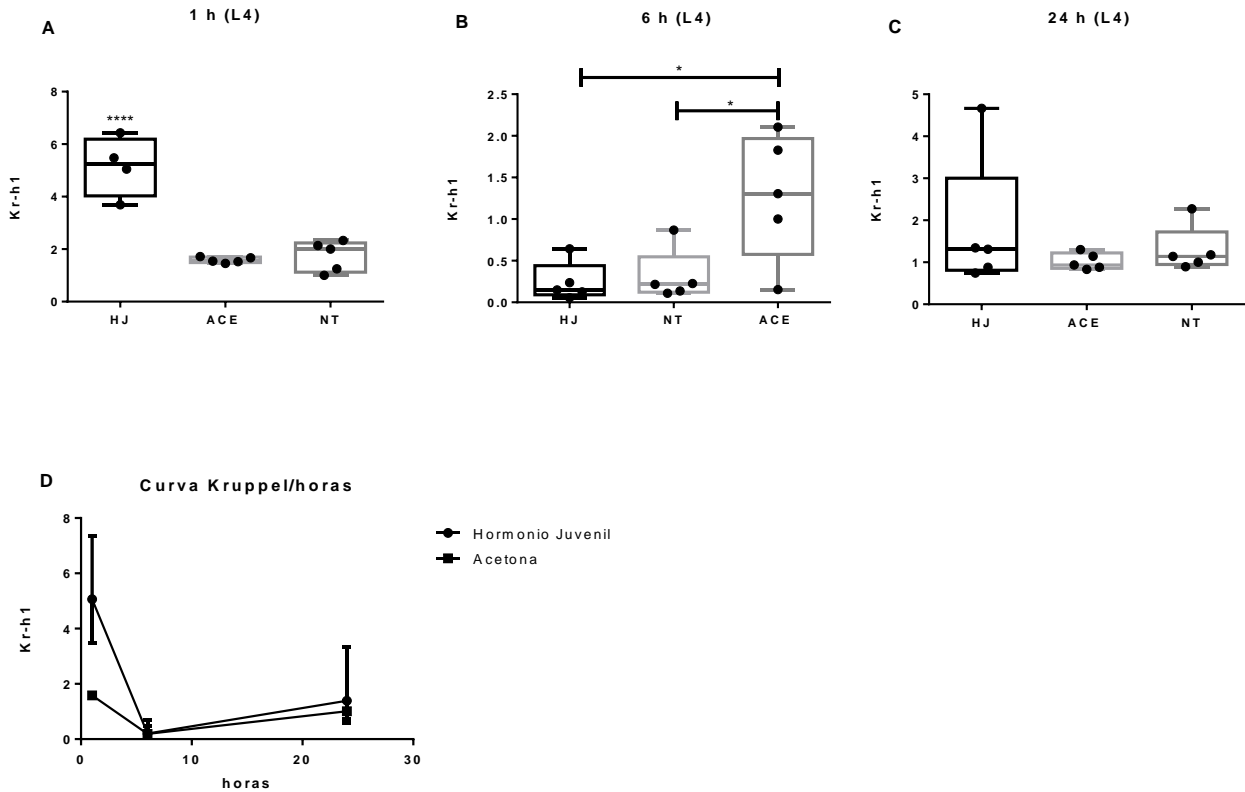
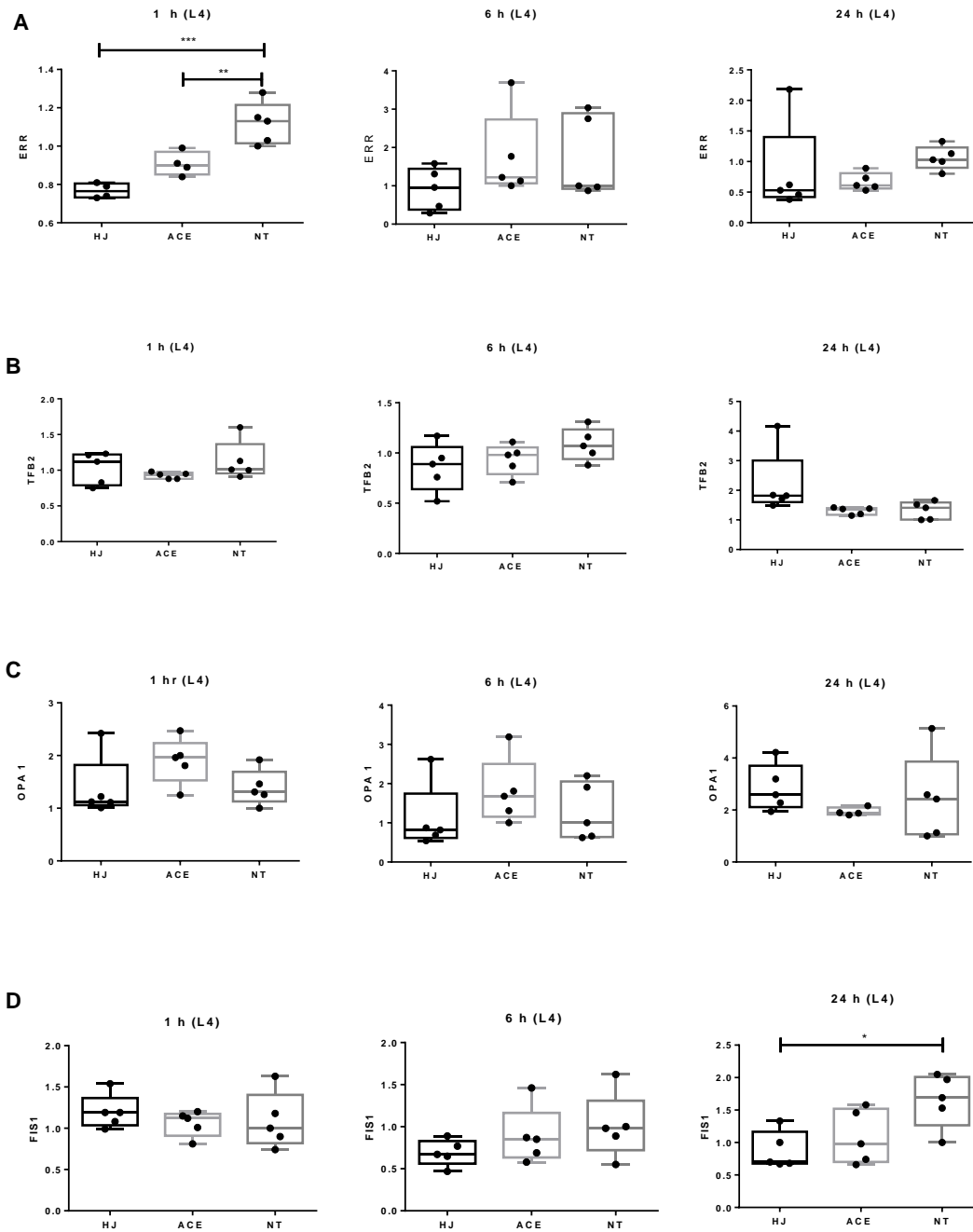


Figura 4 - Análise da expressão relativa por RT-qPCR do gene *Kr-h1* em larvas de *A. mellifera* do quarto instar larval (L4). Após 1 hora de tratamento de aplicação tópica de HJ (**A**); após 6 horas de tratamento de aplicação tópica de HJ (**B**); após 24 horas de tratamento de aplicação tópica de HJ (**C**); Perfil de expressão de *Kr-h1* em função do tempo de tratamento com HJ, representando as medianas e adotando IC = 95% (**D**). Os *box plots* apresentam os valores individuais de cada amostra junta a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibradora. A significância estatística foi analisada por *One-way* ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

Figura 5- Expressão relativa dos genes *ERR*, *TFB2*, *OPA1* e *FIS1* em larvas L4



Figura

5: Análise da expressão relativa dos genes *ERR*, *TFB2* e *OPA1* e *FIS1* em larvas do quarto instar larval (L4) de *Apis mellifera* em diferentes tempos após o tratamento; grupo HJ, tratado com HJ; grupo AC, controle tratado com solvente, acetona; NT, grupo controle não tratado. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tratamento para os genes *ERR* (A), *TFB2* (B), *OPA1* (C) e *FIS1* (D). Os *box plots* apresentam os valores individuais de cada amostra junto a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibrador. A significância estatística foi analisada por *One-way ANOVA* e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Figura 6- Expressão relativa dos genes *TOR* e *FoxO* em larvas L4

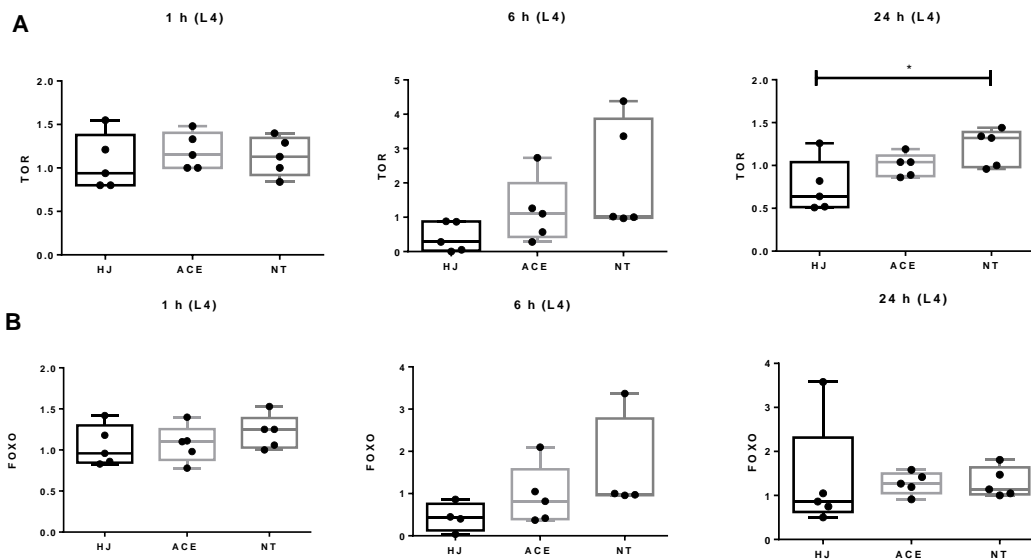


Figura 6: Análise da expressão relativa dos genes *TOR* e *FoxO* em larvas do quarto instar larval (L4) de *Apis mellifera* em diferentes tempos após o tratamento; grupo HJ, tratado com HJ; grupo AC, controle tratado com solvente, acetona; NT, grupo controle não tratado. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tratamento para os genes *TOR*(**A**), *FoxO*(**B**). Os *box plots* apresentam os valores individuais de cada amostra junto a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibrador. A significância estatística foi analisada por *One-way* ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$).

Figura 7- Expressão relativa dos genes *Fatiga* e *Sima* em larvas L4

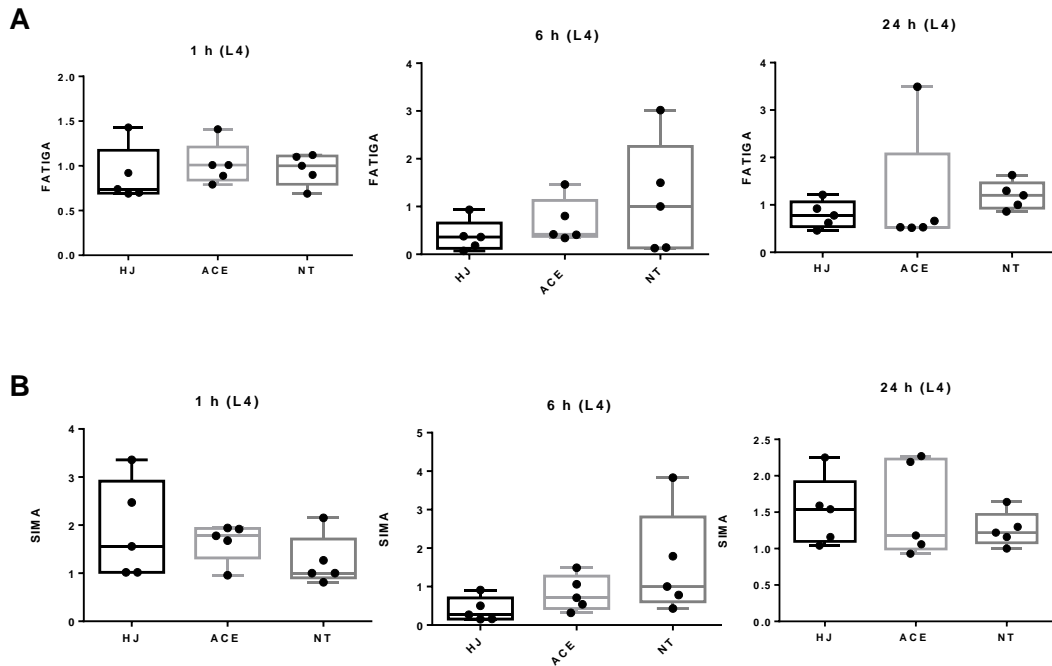


Figura 7: Análise da expressão relativa dos genes *Fatiga* e *Sima* em larvas do quarto instar larval (L4) de *Apis mellifera* em diferentes tempos após o tratamento; grupo HJ, tratado com HJ; grupo AC, controle tratado com solvente, acetona; NT, grupo controle não tratado. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tratamento para os genes *Fatiga* (A), *Sima* (B). Os box plots apresentam os valores individuais de cada amostra junto a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibrador. A significância estatística foi analisada por *One-way* ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$).

4.1.2 Larvas L5F2

Aqui o objetivo foi de estudar a influência do HJ na modulação do metabolismo em larvas do quinto instar larval. Como fase específica analisamos a expressão gênica no segundo estágio fase de alimentação (L5F2). Além do fato que nesta fase a casta já está quase determinada, esta fase também é de interesse pois é nela que as larvas apresentam o seu maior potencial de metabolismo oxidativo (SANTOS *et al.* 2016), estimulado pelo consumo de grandes quantidades diárias da dieta.

Novamente, para fins de validação do tratamento, foi avaliada a resposta de *Kr-h1*. Os resultados mostram que em L5F2 há uma resposta também imediata ao tratamento, porém mais duradouro do que na fase L4 (Fig. 8). O decaimento dos níveis de expressão do gene de resposta imediata é observado apenas em 24 h após a ação do hormônio sintético (Fig. 8C-8D).

Figura 8- Expressão relativa do gene *Kr-h1* em larvas L5F2

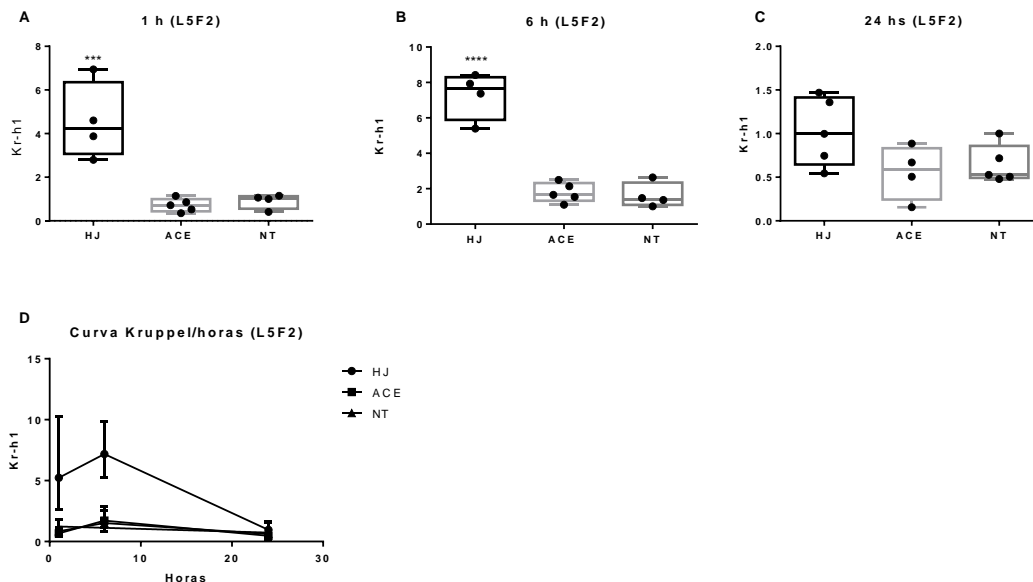


Figura 8 - Análise da expressão relativa por RT-qPCR do gene *Kr-h1* em larvas de *A. mellifera* do quinto instar larval (L5F2). Após 1 hora de tratamento de aplicação tópica de HJ (A); após 6 horas de tratamento de aplicação tópica de HJ (B); após 24 horas de tratamento de aplicação tópica de HJ (C); Perfil de expressão de *Kr-h1* em função do tempo de tratamento com HJ, representando as medianas e adotando IC = 95% (D). Os *box plots* apresentam os valores individuais de cada amostra junta a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibradora. A significância estatística foi analisada por *One-way ANOVA* e teste pós-hoc de Bonferroni (***) $p < 0.001$; ****) $p < 0.0001$.

Após a validação da eficácia do tratamento com HJ, o objetivo foi de estudar os mesmos grupos gênicos avaliados na fase L4. Deste modo, o primeiro grupo foi composto por genes relacionados à mitogênese (*ERR* e *TFB2*). Considerando o constante dinamismo e remodelamento das mitocôndrias, analisamos também genes relacionados com a biogênese e estruturação desta organela. Selecionamos *OPA 1* (*Optic atrophy protein 1*) e *FIS 1* (*Mitochondrial fission 1 protein*), responsáveis pela fusão da membrana interna e com o processo de fissão mitocondrial, respectivamente (**Fig. 9**). Os resultados obtidos para esse grupo gênico apresentam claras diferenças em relação à influência do HJ quando comparados à fase L4. As diferenças podem ser notadas, por exemplo, na intensa diminuição que o HJ causou sobre a expressão do gene *ERR* após 24 h de tratamento quando comparado ao grupo não tratado (**Fig. 9A**). No entanto, observa-se que não houve diferença estatística quando comparado ao grupo controle AC, muito possivelmente devido à grande variância encontrada nas replicatas biológicas deste grupo controle. Já em relação ao segundo gene controlador da biogênese mitocondrial, *TFB2*, não foi observado nenhum grau de influência do tratamento com o hormônio sintético na modulação da expressão gênica (**Fig. 9B**). Por outro lado, o gene relacionado ao processo de fusão mitocondrial, *OPA1*, teve a sua transcrição estimulada pelo hormônio, quando comparado ao grupo não tratado. Entretanto, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle AC (**Fig. 9C**). Por fim, se por um lado o HJ causou um aumento nos níveis da expressão de proteínas mitocondriais fusionais em 6 h após o tratamento, esse mesmo hormônio foi capaz de diminuir os níveis de expressão genica de proteínas responsáveis pela fissão mitocondrial, como *FIS1* após 24 h de tratamento (**Fig. 9D**). Neste último caso, observa-se a clara influência de HJ na modulação transcricional deste gene em relação aos grupos controles.

Assim como em L4, foi estudado o segundo grupo relacionado às vias de controle de sinalização do crescimento; *TOR* e *FoxO* (**Fig. 10**). Comparado a fase anterior, o HJ também não exerceu modulação significativa nos níveis de expressão do gene *TOR* (**Fig. 10A**). Por outro lado, o gene *FoxO* sofreu redução nos níveis de seus transcritos após 24 h de tratamento quando comparado ao grupo não tratado (**Fig. 10B**). Entretanto, não apresentou diferença estatística na comparação com o grupo controle do solvente acetona.

Por fim foi analisado o grupo constituído por genes relacionados à reposta hipóxica. Não detectamos nenhuma influência do hormônio nos níveis de expressão do gene *fatiga* (**Fig.**

11A) e apenas uma pequena modulação dos níveis do RNA mensageiro do gene *sima* em 6 h após o trabalho com HJ, quando comparado ao grupo não tratado, porém sem diferença quanto ao grupo tratado solvente (**Fig. 11B**).

Figura 9- Expressão relativa dos genes *ERR*, *TFB2*, *OPA1* e *FIS1* em larvas L5F2

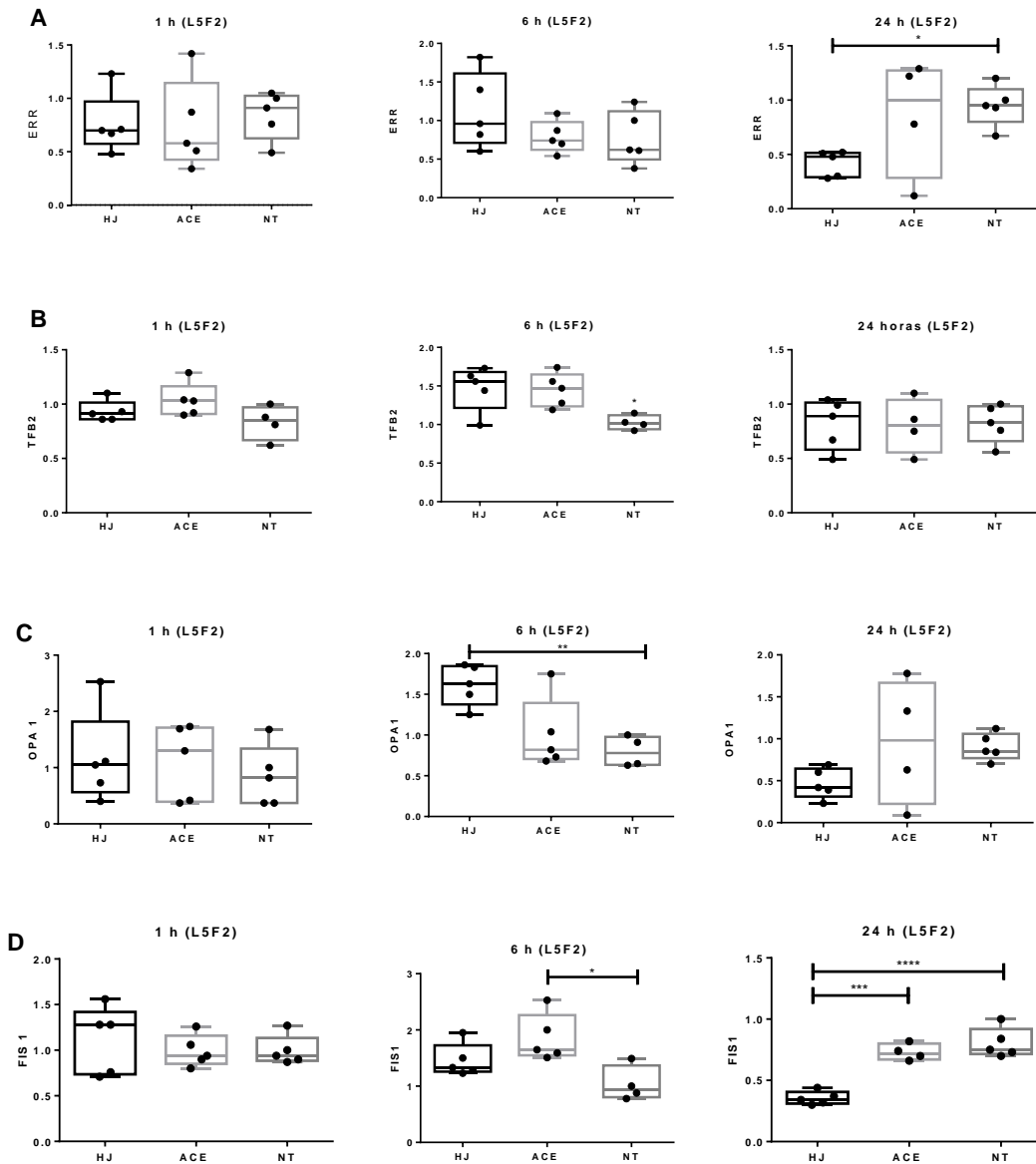


Figura 9: Análise da expressão relativa dos genes *ERR*, *TFB2*, *OPA1* e *FIS1* em larvas do quinto instar larval (L5F2) de *Apis mellifera* em diferentes tempos após o tratamento; grupo HJ, tratado com HJ; grupo AC, controle tratado com solvente, acetona; NT, grupo controle não tratado. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tratamento para os genes *ERR* (A), *TFB2* (B), *OPA1* (C), *FIS1* (D). Os *box plots* apresentam os valores individuais de cada amostra junto a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibrador. A significância estatística foi analisada por *One-way ANOVA* e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Figura 10- Expressão relativa dos genes *TOR* e *FoxO* em larvas L5F2

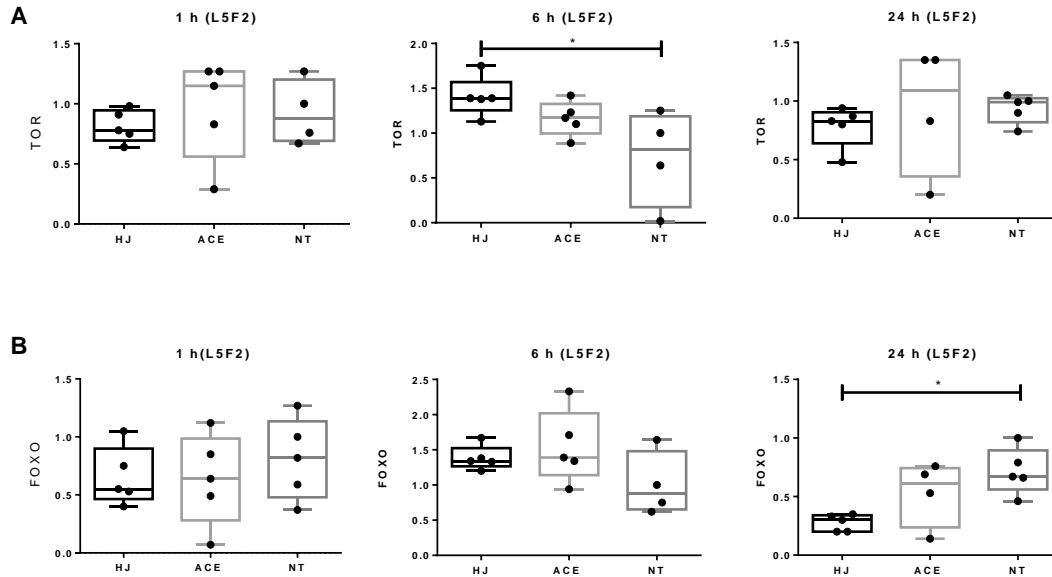


Figura 10:

Análise da expressão relativa dos genes *TOR* e *FOXO* em larvas do quinto instar larval (L5F2) de *Apis mellifera* em diferentes tempos após o tratamento; grupo HJ, tratado com HJ; grupo AC, controle tratado com acetona; NT, grupo controle não tratado. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tratamento para os genes *TOR* **(A)**, *FoxO* **(B)**. Os *box plots* apresentam os valores individuais de cada amostra junto a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibrador. A significância estatística foi analisada por *One-way ANOVA* e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$).

Figura 11- Expressão relativa dos genes *Fatiga* e *Sima* em larvas L5F2

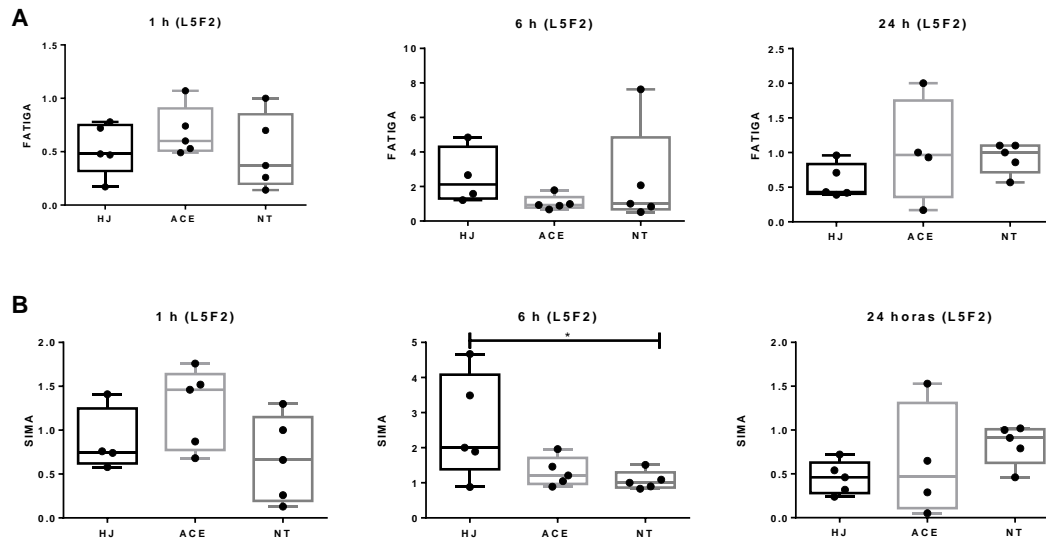


Figura 11:

Análise da expressão relativa dos genes *Fatiga* e *Sima* em larvas do quinto instar larval (L5F2) de *Apis mellifera* em diferentes tempos após o tratamento; grupo HJ, tratado com HJ; grupo AC, controle tratado com solvente, acetona; NT, grupo controle não tratado. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR nos intervalos de 1, 6 e 24 horas de tratamento para os genes *Fatiga* (A), *Sima* (B). Os box plots apresentam os valores individuais de cada amostra junto a mediana e os quartis internos e externos. Os níveis da expressão relativa foram obtidos através de RT-qPCR e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a expressão do gene normalizador *RPL32* e uma amostra do grupo controle como referência calibrador. A significância estatística foi analisada por *One-way* ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0.05$).

4.2 Ensaios de respirometria de alta resolução

De acordo com a resposta de *Kr-h1* ao longo do tempo em L5F2 esperava-se que o grupo de larvas tratadas com HJ tivesse um metabolismo mais ativo, assim como uma maior expressão dos genes envolvidos em modulação mitocondrial, metabolismo oxidativo e regulação. Ainda que a resposta desses genes não fosse imediata, era de se esperar que, com o passar das horas, essas vias sofressem alguma forma de modulação. No entanto, a abordagem transcricional possui limitações em responder como realmente se comporta o metabolismo larval sob ação do HJ. Sendo assim, a partir dos resultados dos ensaios anteriores de RT-qPCR, nos perguntamos se o HJ poderia atuar por algum outro modo, por exemplo não transcricional, e modular a atividade das mitocôndrias do corpo gorduroso. Para elucidar isso, realizamos experimentos de respirometria de alta resolução (Santos *et al.*, 2018). Dessa forma é possível analisar os níveis de O_2 em consumo basal, fosforilação, capacidade do complexo II, vazamento de prótons e máxima capacidade de transporte de elétrons (desacoplamento).

Os resultados obtidos por esta abordagem experimental demonstraram, no entanto, que larvas expostas ao HJ após 1 h (**Fig. 12**) e 6 h (**Fig. 13**) não apresentam diferença estatística nos níveis de consumo de oxigênio em nenhuma situação de modulação entre os grupos tratado e controle.

Figura 12- Respirometria de alta resolução em larvas L5F2 após 1 hora de tratamento com HJ.

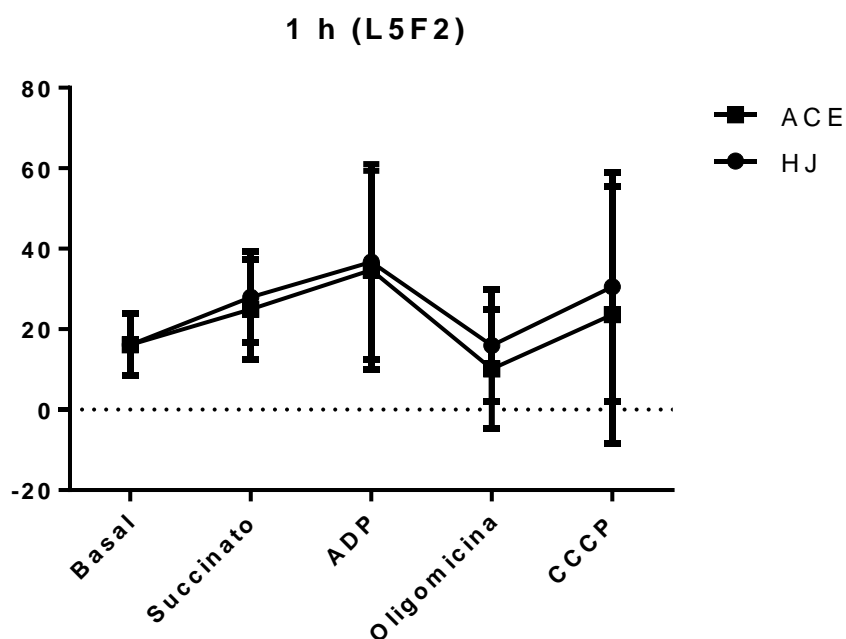


Figura 12 - Resultado dos ensaios de respirometria de alta resolução em amostras de corpo gorduroso dissecadas após 1 hora de ação do HJ, mostrando as curvas de consumo de O₂ em diferentes estados mitocondriais a partir da modulação através das drogas succinato, ADP, oligomicina e CCCP. O gráfico mostra as médias e desvio padrão calculadas individualmente para cada experimento (n=5). A distribuição dos dados foi em conformidade para realizado de teste *two-way ANOVA*. Entretanto não houve diferença estatística entre os dois grupos, larvas tratadas com HJ e larvas tratadas com solvente (AC).

Figura 13- Respirometria de alta resolução em larvas L5F2 após 6 horas de tratamento com HJ.

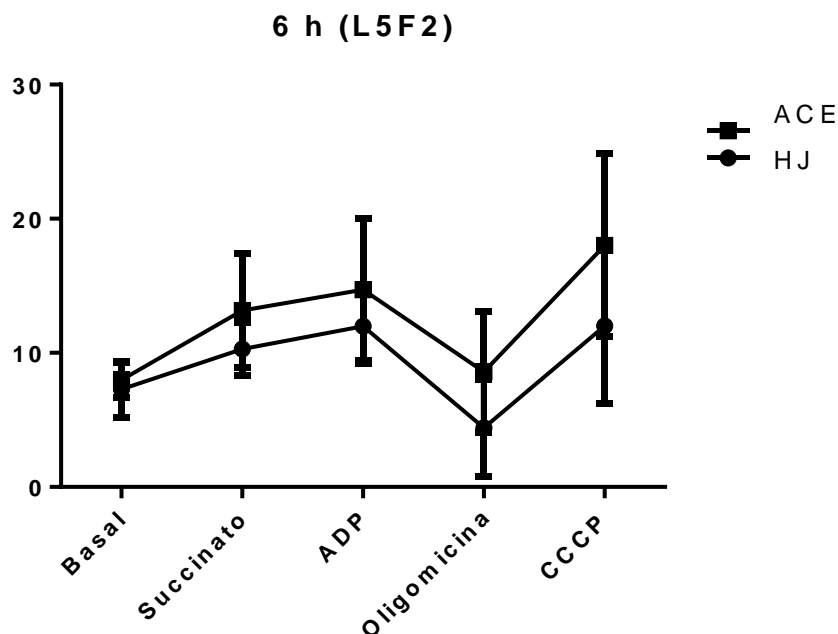


Figura 13 - Resultado dos ensaios de respirometria de alta resolução em amostras de corpo gorduroso dissecadas após 6 hora de ação do HJ, mostrando as curvas de consumo de O₂ em diferentes estados mitocondriais a partir da modulação através das drogas succinato, ADP, oligomicina e CCCP. O gráfico mostra as médias e desvio padrão calculadas individualmente para cada experimento (n=5). A distribuição dos dados foi em conformidade para realizado de teste *two-way ANOVA*. Entretanto não houve diferença estatística entre os dois grupos, larvas tratadas com HJ e larvas tratadas com solvente (AC).

4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nessa abordagem investigamos a questão morfológica das mitocôndrias, uma vez que Santos *et al.* (2016) notaram uma diferença marcante entre o formato das mitocôndrias do corpo gorduroso de larvas de rainha (**Fig. 14**) e de operária. Para responder a questão que tal diferença morfológica pode ser atribuída às diferenças nos níveis endógenos de HJ, analisamos a morfologia das mitocôndrias do corpo gorduroso das larvas L5F2 após 1 h e 6 h de exposição ao HJ e do grupo controle (AC) por meio de microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 14- Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de corpo gorduroso de larvas de rainha no estágio L5F2.

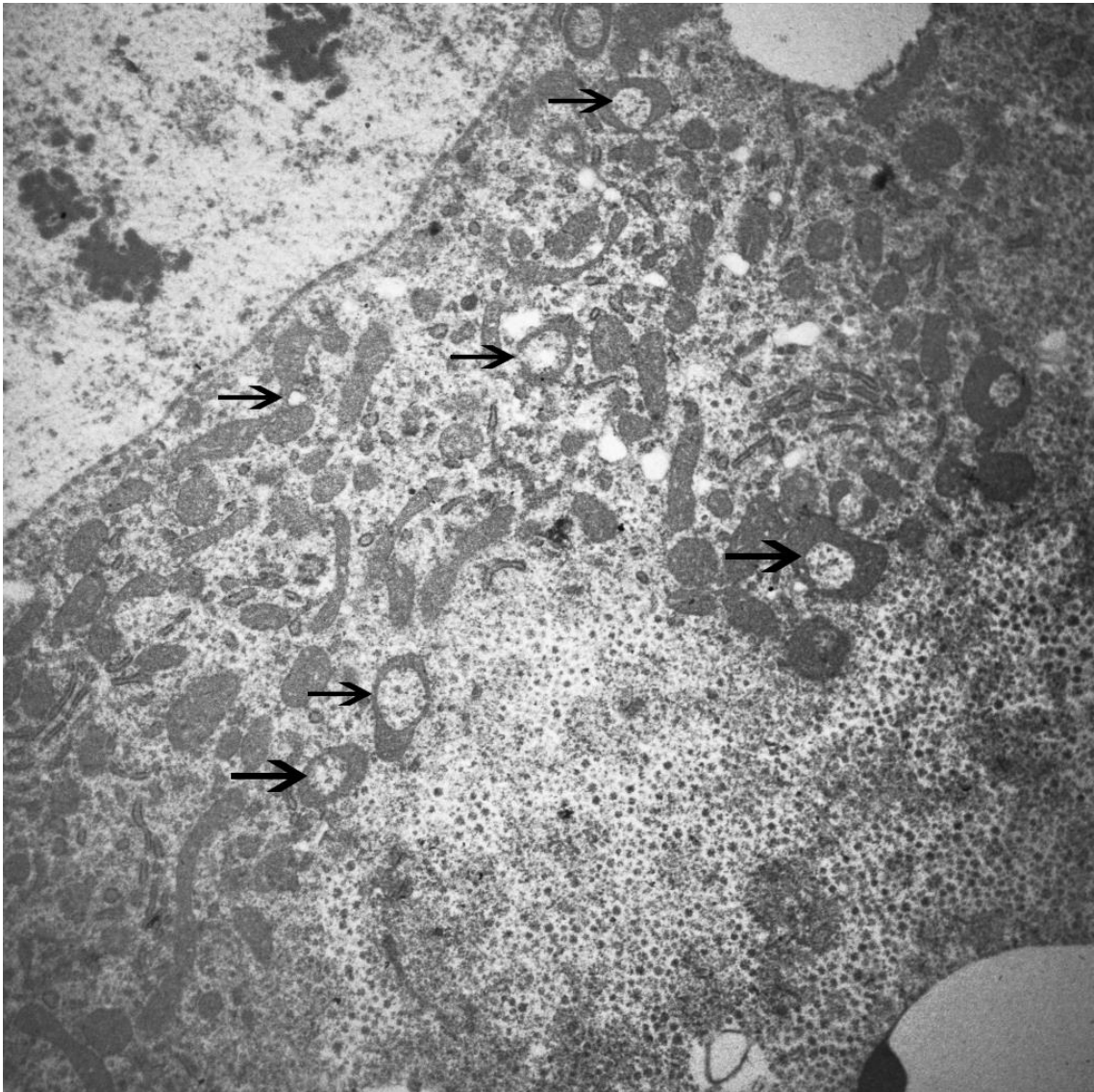


Figura 14 – Eletromicrografia de célula do corpo gorduroso de larvas de rainha. As setas indicam mitocôndrias em forma de cálice. Imagem retiradas de Santos et al (2016).

Figura 15- Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de larvas L5 após 1 hora de tratamento.

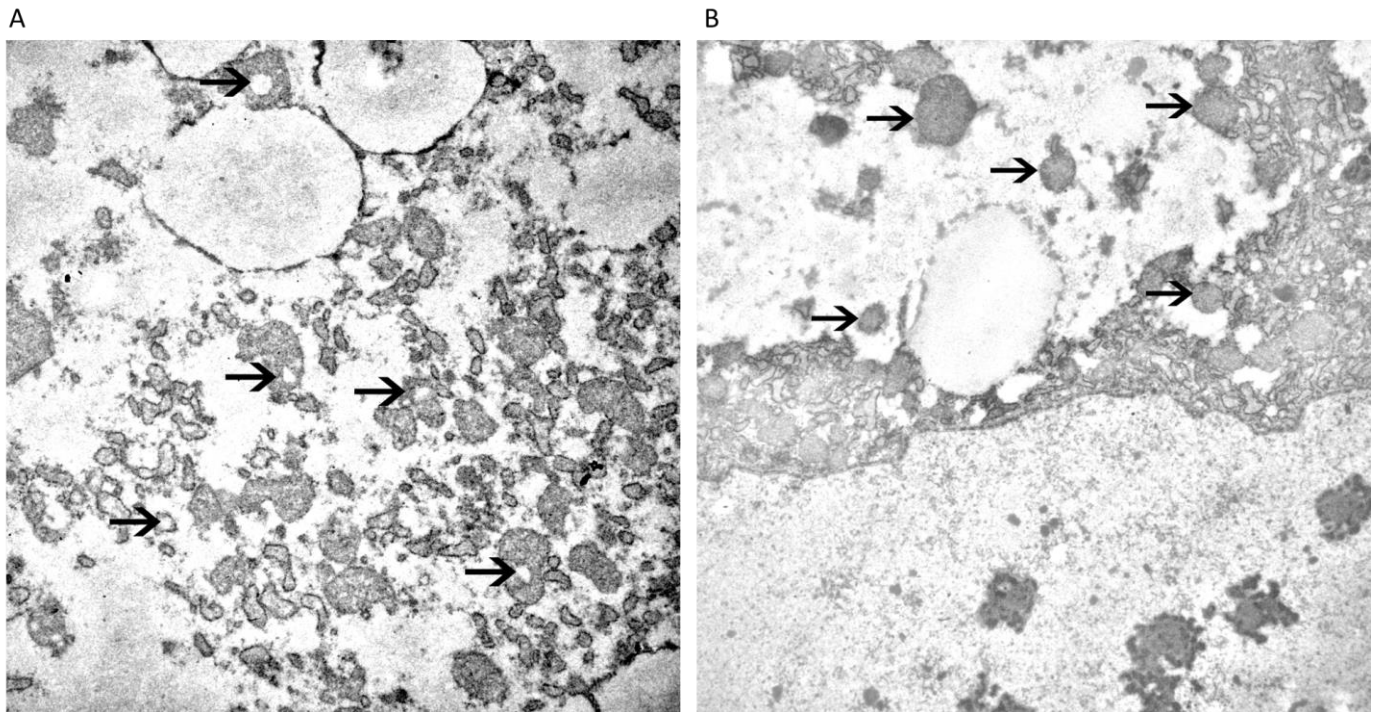
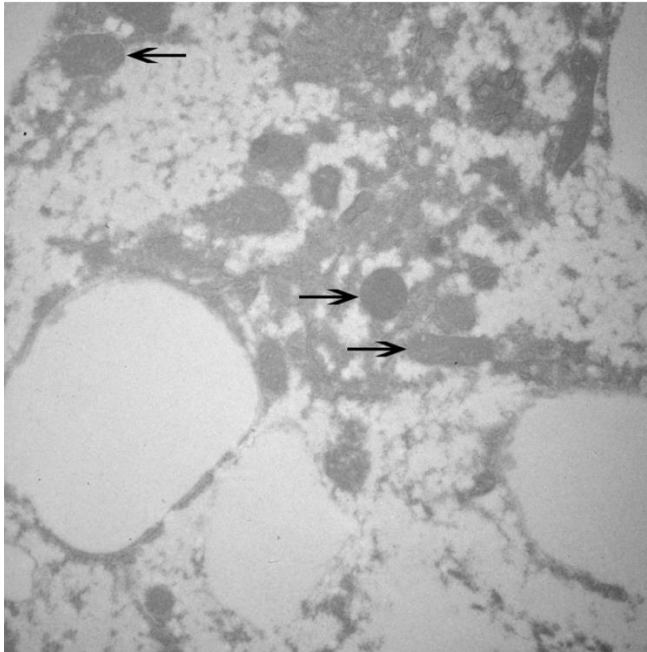


Figura 15 – Eletromicrografias de células do corpo gorduroso de larvas L5F2 após 1 h de tratamento com HJ. As setas indicam mitocôndrias em cada grupo analisado. Larvas do grupo experimental HJ (A) apresentam grande fissura no interior da organela; larvas de operária do grupo controle expostas ao solvente (B) não apresentaram tais alterações morfológicas.

Figura 16- Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de larvas L5F2 após 6 horas de tratamento.

A



B

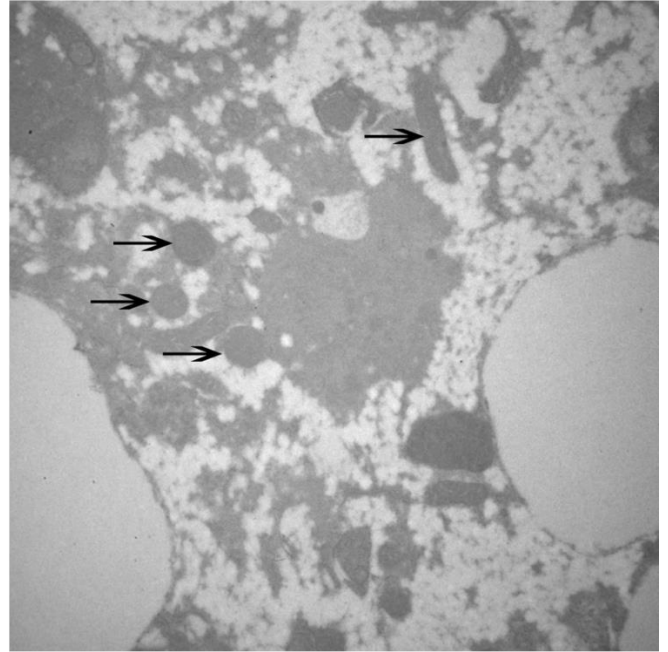


Figura 16 - Eletromicrografias de células do corpo gorduroso de larvas L5F2 expostas a HJ por 6 horas apresentando formato normal (A); larvas de operária do grupo controle expostas ao solvente, também sem apresentar alterações morfológicas (B). As setas indicam mitocôndrias em cada grupo analisado

5. DISCUSSÃO

5.1 – Larvas L4

Ao analisar o perfil de expressão de *Kr-h1* na fase L4, percebemos uma resposta rápida e transiente desse gene à presença de HJ. Os níveis de expressão aumentaram rapidamente já a 1 h após o tratamento das larvas com HJ (**Fig. 4**) e diminuíram igualmente rápido até 6 h após o tratamento. Essa notável dinâmica na expressão de *Kr-h1* é compatível com genes de resposta imediata a hormônios morfogenéticos, como já há tempo documentado no modelo Ashburner para ecdisona (THUMMEL, 2002). Ademais, para experimentos que utilizam hormônios exógenos, sintéticos para estimular respostas moleculares e fisiológicas, é compreensível que a resposta rápida e transiente representa uma reação de compensação biológica ao hormônio externo, que inclusive pode ser acompanhado por uma rápida ativação de vias bioquímicas de degradação, possivelmente por meio de HJ esterase (MACKERT et al., 2008). Já os resultados da fase larval seguinte (L5F2) mostrou uma dinâmica mais persistente no aumento dos níveis de expressão de *Kr-h1* até 6 h após o tratamento com HJ (**Fig. 8**). Assim seria possível que nessa fase larval (L5F2), que apresenta um metabolismo oxidativo mais intenso que na fase L4 (SANTOS *et al.*, 2016) os genes relacionados à dinâmica mitocondrial possam apresentar uma resposta maior ao hormônio.

Em termos de resposta ao HJ destaca-se o gene *Estrogen-Related Receptor (ERR)*, regulador nutricional envolvido na transcrição de genes nucleares de regulação mitocondrial (SCARPULLA, 2008; DOMINY; PUIGSERVER, 2013). Esse gene leva o nome devido à sua função quando descoberto em mamíferos, porém, não possui nenhuma relação com estrógeno em insetos, já que não possuem essa via hormonal em sua fisiologia. Nossa atenção foi voltada a esse gene por sua notável ligação com vias de sensoriamento de nutrientes e metabolismo oxidativo, assim como sua atuação no desenvolvimento e proliferação celular em larvas. Por exemplo, experimentos com *Drosophila melanogaster* demonstraram que mutantes do gene *dERR* morrem ainda na fase larval, com baixos níveis de ATP e altos níveis de açúcar circulante na hemolinfa, sugerindo uma possível ligação entre geração de energia celular e metabolismo de carboidratos (TENNESSEN *et al.*, 2011). Ainda em *D. melanogaster*, sugere-se que esse gene possui uma íntima ligação com as vias de hipóxia e regulação da mesma (LI *et al.*, 2013). Segundo Santos *et al.* (2016), a expressão do ortólogo desse gene é maior em larvas de rainha de *A. mellifera*, indicando uma relação com a dieta de geleia real, que é mais rica em açúcares

que o alimento oferecido às operárias. Entretanto, ao contrário do esperado, em nossos resultados notamos que há uma diminuição nos transcritos *ERR* no grupo de larvas L4 tratado com HJ no intervalo de tempo mais curto (1 h) como resposta imediata ao tratamento (**Fig. 5**). No entanto, em larvas do quinto instar (L5F2) tal somente foi observado a 24 h após o tratamento (**Fig. 9**).

Os genes *TFB2* e *FoxO* foram escolhidos nesse trabalho baseado em estudos anteriores (WHEELER; et al., 2014; SANTOS et al., 2016) que demonstraram que os mesmos podem estar relacionados a diferenças entre as duas castas na fase larval, especificamente com o metabolismo oxidativo e respiração celular. Segundo Santos *et. al.* (2016) o gene *TFB2* é um fator de transcrição que pode ser um regulador da diferença mitocondrial fenotípica encontrada em amostras de corpo gorduroso de larvas de rainha e operária em resposta à alimentação diferencial. No entanto, não foi possível observar nenhuma diferença significativa nos transcritos deste gene quando relacionado ao tratamento por HJ. Possivelmente, esse gene tenha um efeito modulatório citado por Santos, porém esta resposta independe do efeito hormonal desencadeado por HJ, sendo de fato relacionado às diferentes dietas oferecidas, uma vez que em nosso experimento as larvas receberam uma dieta padronizada e em igual quantidade.

Da mesma forma, o gene *FoxO* também não apresentou nenhuma diferença significativa na resposta ao HJ nas fases de desenvolvimento estudadas. Entretanto, esse gene é um importante conector entre a sinalização por HJ e insulina em *D. melanogaster*, conhecido também por ser um regulador da expressão dos receptores de insulina, atuando em *feedback* negativo. (MIRTH *et.al.*, 2014; PUIG; TJIAN, 2005).

Os genes da via de hipóxia cuja expressão avaliamos em resposta ao HJ possuem estreita relação com a via de sensoriamento IIS/TOR, assim como com a disponibilidade de oxigênio no meio e captação do mesmo pelas mitocôndrias. Segundo Azevedo *et al.* (2011), há uma tendência de que, em larvas de operárias em desenvolvimento, os principais genes envolvidos na via de hipóxia se mantenham em maior atividade quando comparados com larvas de rainhas. Essa atividade, porém, é percebida a partir do quinto instar larval, mantendo-se sem diferença significativa em larvas L4. Os genes homólogos da via de hipóxia

SIMA (HIF- α) e *FATIGA (PHD)* analisados aqui neste trabalho não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos observados experimentalmente em L4.

5.2 Larvas L5F2

Analisamos para esta fase de desenvolvimento os mesmos genes alvo como para L4. Especificamente no que diz respeito ao gene de resposta imediata ao HJ (*Kr-h1*) notamos uma resposta maior e mais constante ao hormônio (**Fig 8**), demonstrando uma resposta ainda mais clara da influência direta do HJ nos tecidos.

Quanto aos genes de sensoriamento de nutrientes foi possível observar a diminuição nos transcritos de *FoxO* no grupo tratado com HJ quando comparado ao grupo NT, no entanto, essa resposta não foi observada quando comparado ao grupo ACE que acompanha o perfil de expressão gênica de HJ (**Fig. 10B**), evidenciando o efeito de acetona sobre o tratamento. Semelhantemente, observamos a resposta de *TOR* no intervalo de 6 horas de tratamento, onde há um aumento na expressão desse gene no grupo tratado, resposta que também é acompanhada pelo grupo ACE (**Fig. 10A**).

O gene *OPA1*, relacionado com a dinâmica estrutural das mitocôndrias, demonstrou um aumento no nível dos transcritos ao intervalo de 6 horas após o tratamento com HJ (**Fig. 9C**). Já em respeito ao gene *Fis1*, foi possível observar uma expressiva diminuição dos transcritos 24 horas após o tratamento com HJ (**Fig. 9D**). Esse gene é caracterizado como um componente da maquinaria de fissão na superfície mitocondrial e é sugerido que em mamíferos o aumento de sua expressão resulta na fragmentação mitocondrial resultando em agregados, assim como a sua depleção induz a formação de extensões e interconexões de túbulos mitocondriais (STOJANOVSKI et al., 2004). A diminuição que observamos na expressão do gene *OPA1* em nosso experimento com larvas na fase L5F2 indica que o HJ influencia na dinâmica da morfologia das mitocôndrias, ainda que a resposta ocorra relativamente tardia. Assim, sugere-se que, ao passo que o gene *OPA1* tem sua expressão aumentada por HJ, a tendência é que o gene *FIS1* diminua em seguida no próximo intervalo de tempo, que antecede a mudança de fase larval.

5.2.1 – Respirometria de alta resolução

Nossos resultados não apontam diferença estatística entre os grupos experimentais, independentemente do tempo da dissecação do corpo gorduroso das larvas após o tratamento (**Figuras 12 e 13**). Tal indica que os níveis de respiração celular aparentemente não são diretamente influenciados pelo HJ. Tal resultado é contrário ao de Stepien *et. al* (1987) que realizaram administração de HJ em cultura de células de *Drosophila*, onde observaram que o hormônio atuava diretamente na atividade respiratória mitocondrial. Dessa forma, embora haja evidências de que o metabolismo oxidativo de larvas de rainhas seja mais ativo que o de operárias nessa fase larval (SANTOS *et al.*, 2016), nosso experimento indica que o HJ não é um fator decisivo neste processo de regulação metabólica.

5.2.2 – Microscopia eletrônica de transmissão

Ao analisar a ultraestrutura das mitocôndrias em glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*, Farkas e Sut'áková (2001) encontraram uma notável mudança morfológica após exposição ao HJ por 1 hora, semelhante à mudança encontrada quando as mesmas eram expostas a drogas desacopladoras de fosforilação oxidativa. Essa mudança ultraestrutural, também conhecida como turgescência, poderia ser um forte indicador do aumento da capacidade oxidativa da célula. Em larvas de *A. mellifera*, Santos *et. al.* (2016) também notaram diferenças na morfologia das mitocôndrias do corpo gorduroso das larvas. Evidenciaram que algumas das mitocôndrias de rainhas se encontravam em formato de cálice e com fendas incomuns à estrutura normal da organela (**Fig. 14**), condição interpretada como relacionada a situações de estresse.

Ao analisarmos as micrografias eletrônicas de preparações de corpo gorduroso das larvas L4 e L5F2 tratadas ou não com HJ observamos que após 1 h do tratamento com HJ a morfologia das mitocôndrias assemelhou-se às encontradas em larvas de rainha (**Fig. 15A**). Tal não ocorreu com as mitocôndrias do grupo tratado com solvente (**Fig. 15B**). Desta forma é possível concluir que o hormônio teve um efeito desacoplador nas mitocôndrias. O que impressiona é que esse efeito foi observado já após pouco tempo (1 h) após a exposição. Entretanto, essa alteração morfológica não se transformou em diferenças significativas na

atividade mitocondrial avaliada nos experimentos de respirometria de alta resolução ou de expressão de genes regulatórios, ambos descritos anteriormente.

De fato, a resposta rápida na morfologia mitocondrial aparentemente se reverteu logo, uma vez que aos 6 h após o tratamento com HJ as mitocôndrias já tinham voltado ao seu formato normal, sem apresentar fissuras anormais (**Fig 16**). Como evidenciado anteriormente, esta é a janela do tempo em que a expressão do gene *OPA1* foi afetado positivamente pelo HJ, indicando que esse gene possa ter um papel dinâmico na regulação da morfologia mitocondrial, especialmente no processo de fusão interna das membranas. Aparentemente trata-se de uma resposta muito dinâmica, já que aos 6 h após o tratamento as mitocôndrias do grupo tratado com HJ voltaram ao seu formato normal. O gene *OPA1* foi identificado como um protetor da atividade mitocondrial (PATTEN *et al.*, 2014). Atuando sobre a ATP sintase, o mesmo favorece a oligomerização dessa proteína e a reversão da sua atividade por meio de alterações no formato das cristas mitocondriais, assim impedindo a inibição da cadeia respiratória (QUINTANA-CABRERA *et al.*, 2018). Os nossos resultados da correlação temporal entre a dinâmica estrutural das mitocôndrias e da expressão do gene *OPA1* sugerem que, após o efeito desacoplador imediato causado pelo hormônio, são ativadas vias de reparo e da regulação morfofisiológica envolvendo *OPA1*. A resposta imediata ao HJ, assim, tem aspectos de resposta a um estresse, que garante a volta rápida da organela à sua conformação natural, sem alterar as taxas de eficiência respiratória. Em outros termos, hipotetizamos que na resposta ao HJ, a proteína *OPA1* teria a capacidade de manter o gradiente eletroquímico de prótons balanceado.

CAPITULO II - Efeitos do hormônio juvenil no perfil transcricional do corpo gorduroso – análises RNA-seq.

6. RESULTADOS

6.1 Qualidade dos dados

Inicialmente, avaliamos a qualidade dos dados de sequenciamento e dos alinhamentos *reads* com o genoma de *A. mellifera*. Obtivemos um bom resultado de sequenciamento (**Fig. 17**). Este gráfico representa o escore *Phred*, valor de qualidade que é atribuído a cada base nucleotídica gerada no sequenciamento. O valor da qualidade Q de *Phred* é definida como uma propriedade logaritmicamente relacionada com a probabilidade de erro ao nomear uma base. Desta forma, um escore *Phred* (q) de número 30 para uma base, demonstra a probabilidade de erro ao nomear essa base de 1 em 1000, enquanto um escore de número 40 demonstra uma probabilidade de erro de 1 em 10.000, base máxima que um sequenciamento *Illumina* consegue atingir. Em nossos dados o limiar se encontra por volta de q = 36, indicando uma possibilidade de erro aproximada de 1 em 4000.

Após o processamento e remoção de adaptadores e de extremidades de baixa qualidade, obtivemos o cálculo da qualidade do alinhamento das *reads* para cada amostra biológica:

Tabela 3- Qualidade de alinhamento

Amostra	Total de <i>reads</i>	<i>Reads</i> pós-processamento	Porcentagem de alinhamento
HJ A	12.149.099	11.203.397	88,95 %
HJ B	17.415.384	16.673.112	89,57 %
HJ C	2.007.619	1.893.174	72,56 %
AC A	7.078.142	6.716.803	89,86 %
AC B	10.593.933	10.182.465	91,79 %
AC C	14.462.360	13.849.204	92,68 %
NT A	2.157.606	2.036.189	69,09 %

NT B	2.656.729	2.485.457	70,40 %
NT C	12.041.288	11.324.356	92,61 %

Tabela 3: Qualidade de alinhamento para cada amostra sequenciada. A segunda coluna mostra a quantidade absoluta de *reads* obtidas pelo sequenciamento. A terceira coluna apresenta a quantidade de *reads* obtidas após o processamento por *Trimming*, que remove os adaptadores e sequencias de qualidade baixa. Finalmente, a última coluna apresenta a porcentagem total de alinhamento a partir das *reads* processadas.

As porcentagens de alinhamento pós-processamento indicam que o alinhamento foi efetivo e de alta qualidade.

Figura 17- Qualidade média das reads obtidas pelo sequenciamento.

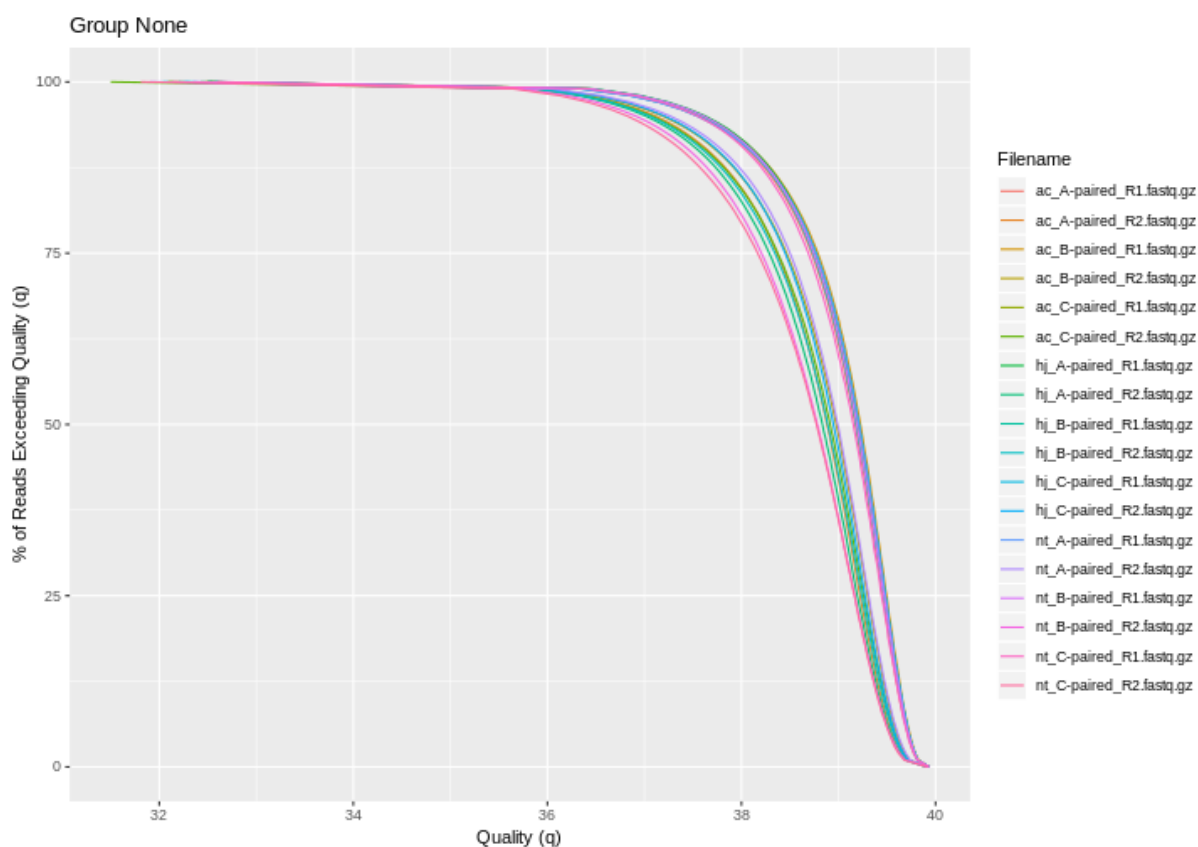


Figura 17 – Padrão de qualidade média do sequenciamento ao nomear cada base, obtido após o processamento. O eixo X mostra os *thresholds* de qualidade (q) e o eixo Y as *reads* em porcentagem que excedem esse valor de q.

6.2 Análise exploratória dos dados

Ao confirmar que tanto o sequenciamento quanto o alinhamento obtiveram resultados de alta qualidade, pudemos dar início à análise exploratória dos dados. O *Heatmap*

representando os padrões gerais de expressão gênica das amostras ilustra que as replicatas do grupo experimental tratado com HJ agrupam bem entre si (**Fig. 18**). Isso é importante pois traz uma grande confiabilidade aos nossos dados, evidenciando que o grupo tratado com HJ se assemelha entre si, enquanto os grupos controle se diferenciam deste.

Figura 18- Heatmap da variância entre as amostras obtida pelo sequenciamento de RNA de larva L5F2 após 6 horas de tratamento com HJ.

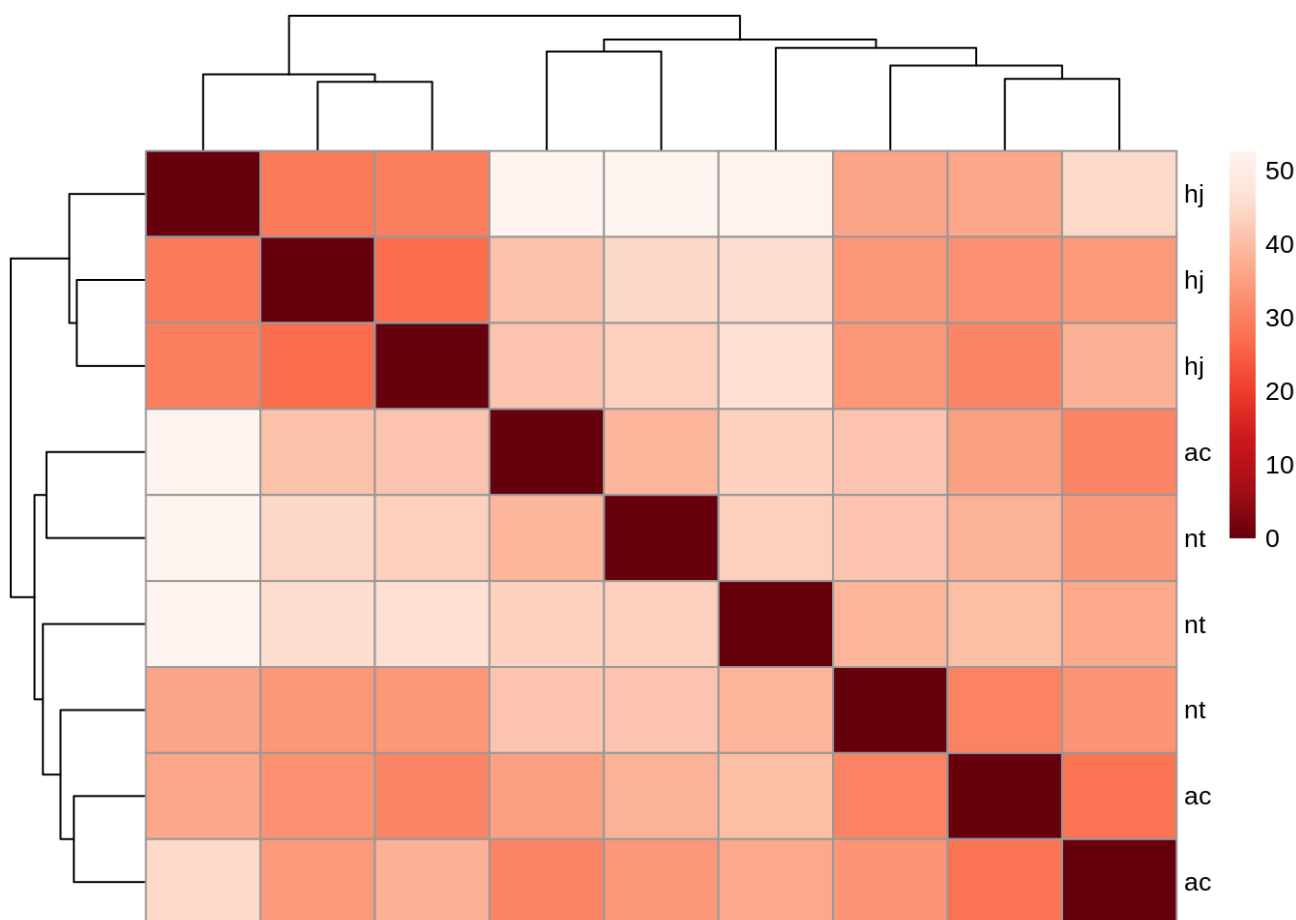
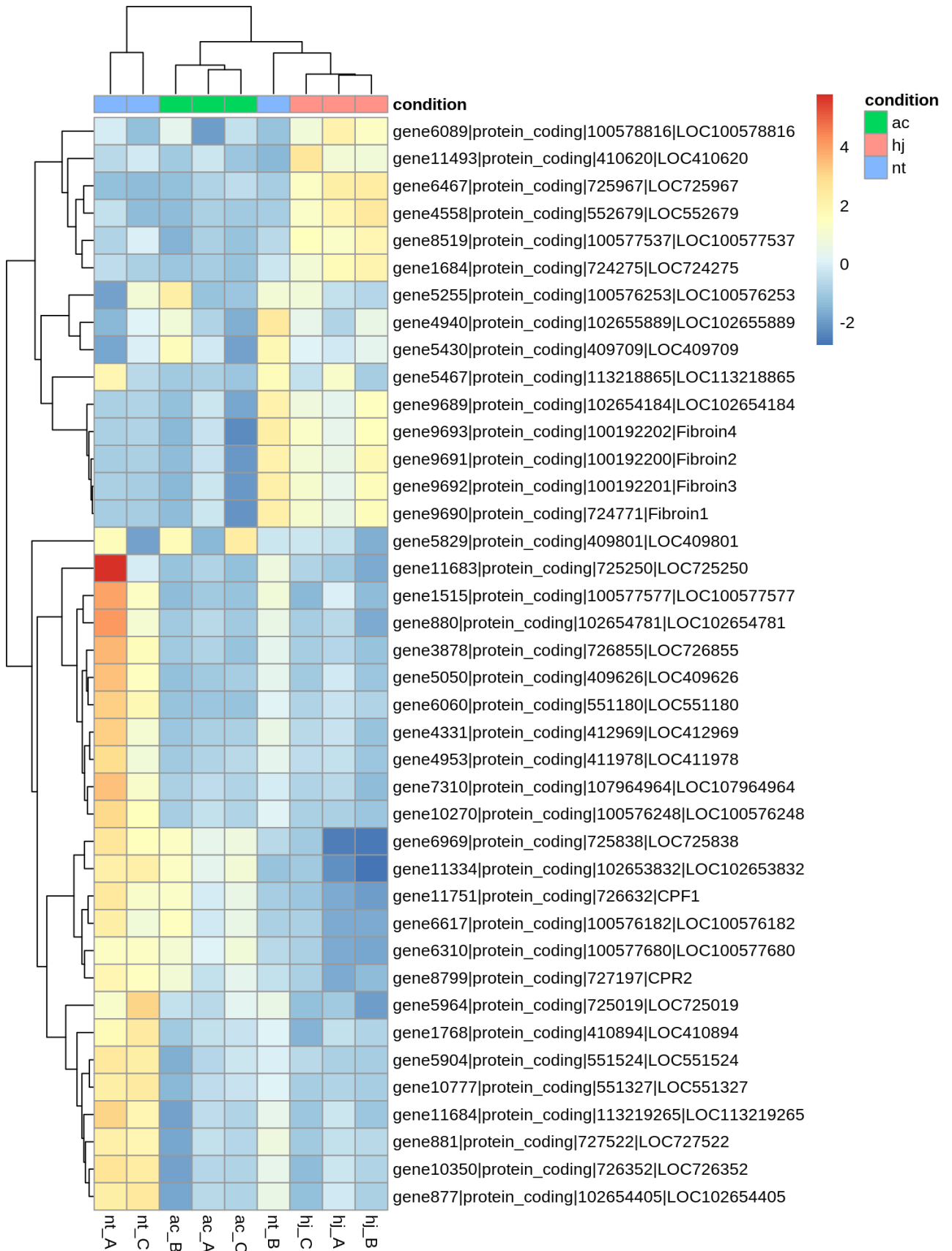


Figura 18 – *Heatmap* obtido através de cálculo de distância euclidiana n-gene-dimensional das contagens normalizadas (usando rlog) entre as amostras, calculando o índice de dissimilaridade entre as amostras. Na diagonal está a distância da amostra em relação a ela mesma, ou seja, 0 (vermelho escuro). Dessa forma, conseguimos agrupar *clusters* afim de iniciar uma análise exploratória.

Um segundo gráfico de *Heatmap* foi gerado, desta vez contendo os 40 genes com maior variância entre os grupos (**Fig. 19**). Aqui, a comparação não é entre os genes, somente

entre amostras. É possível observar que alguns clusters já são formados nesses 40 *top genes*, que serão examinados individualmente.

Figura 19- Heatmap dos 40 genes com maior variância entre os grupos de tratamento. Larvas L5F2 após 6 horas de ação do HJ.



6.3 Análise de expressão gênica diferencial

Como próximo passo, analisamos genes diferencialmente expressos (GDEs) em relação ao controle para cada contraste (HJ vs AC, HJ vs NT e AC vs NT). Consideramos os valores padrão do software. Genes denominados como *up-regulados* ou *down-regulados* eram definidos segundo os valores *log2FoldChange* (Log2FC) ≥ 1 ou ≤ -1 respectivamente, e que tenham valor de significância $p < 0,01$ ajustado para FDR=0.01. Plotamos três gráficos do tipo volcano para uma melhor representação dos dados (**Fig. 20**). Nesses, a distribuição dos genes em relação aos parâmetros pré-estabelecidos é representada, com os genes regulados significativamente na cor vermelha. Quando *up-regulados* estes se encontram à direita do plano e quando *down-regulados* à esquerda. Os pontos na cor preta representam genes que não atingiram o valor *cut-off* adotado.

É importante ressaltar que o gene *Kr-h1*, de resposta imediata ao HJ, é encontrado como *up-regulado* nos dois contrastes onde se comparou o grupo tratado HJ (HJ vs. AC e HJ vs NT), destacado na cor azul, mas não foi encontrado no contraste entre os grupos controle (**Fig. 20**). Isso corrobora com os dados de RT-qPCR obtidos previamente, indicando que também nesse experimento o tratamento com HJ foi bem-sucedido. No contraste HJ vs AC encontramos 165 GDEs, sendo 59 *down-regulados* e 106 *up-regulados*. No contraste HJ vs NT encontramos 249 DEGs, com 160 *down-regulados* e 89 *up-regulados*. Finalmente, nos contrastes entre os grupos controle AC vs NT, encontramos apenas 27 GDEs, sendo todos regulados negativamente pela aplicação do solvente acetona (**Fig. 20C**).

Figura 20- Genes diferencialmente expressos entre contrastes dos grupos experimentais.

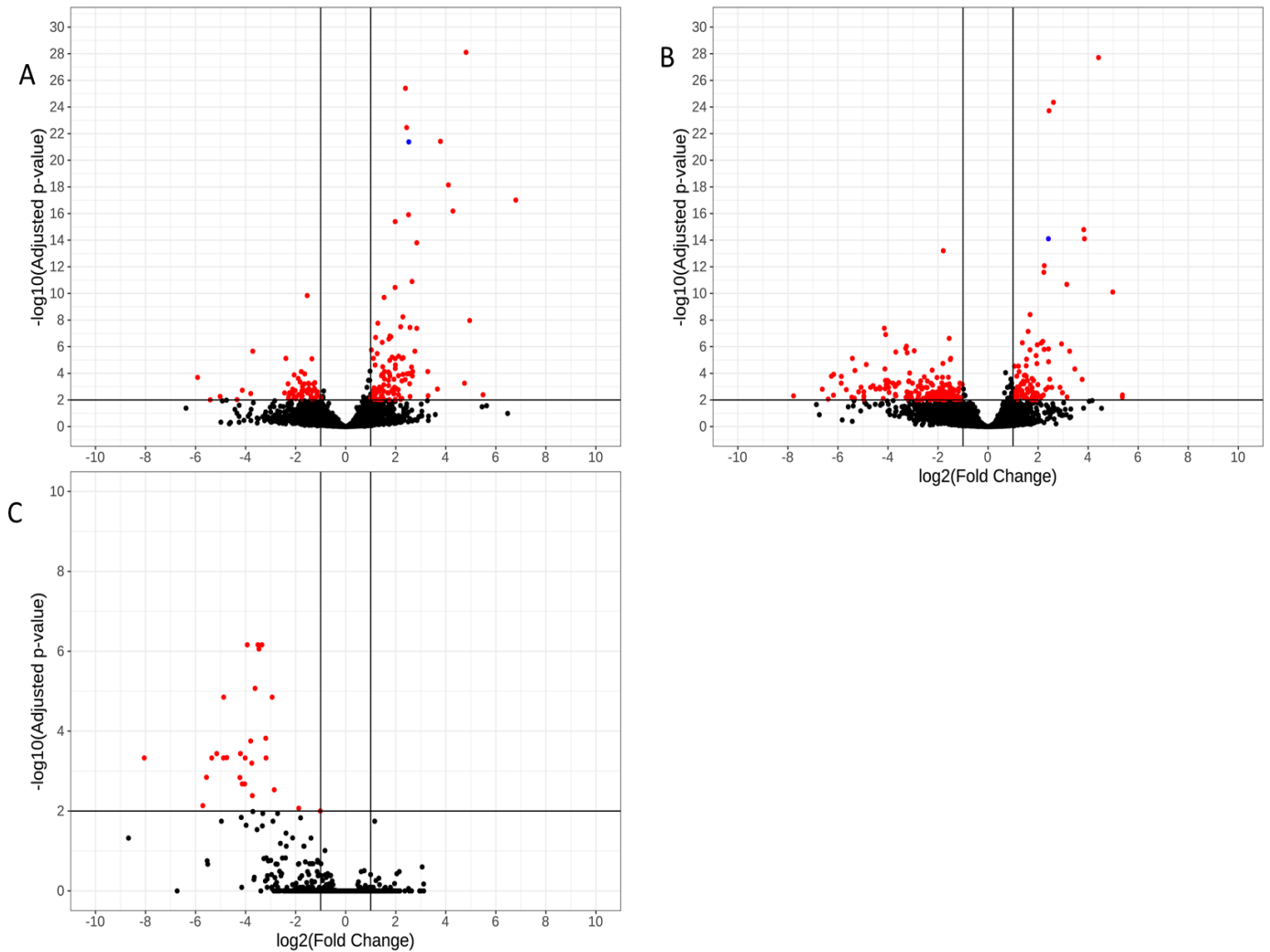


Figura 20 – *Volcano plot* de cada contraste dos grupos experimentais sequenciados, sendo larvas L5F2 após 6 horas de tratamento com HJ em comparação com os grupos controle (solvente acetona e não tratado). (A) GDEs observados no contraste HJ x AC; (B) GDEs observados no contraste HJ x NT; (C) GDEs observados no contraste AC x NT. O eixo X representa o \log_2FC e o eixo y o $-\log_{10}$ do valor p ajustado. Os pontos pretos representam genes que não atingiram os *thresholds* estipulados, e assim são considerados como não diferencialmente expressos, enquanto os vermelhos são aqueles que atingiram os *thresholds*, representando DEGs em relação aos controles. Genes up-regulados são localizados ao lado positivo do plano e down-regulados no lado negativo do plano. Em azul está destacado o gene *Kr-h1*.

Para investigar GDEs mais a fundo e evitar eventuais falsos positivos, aumentamos ainda mais o *threshold cut-off* do \log_2FC de $|1|$ para $|1.5|$, sem alterar o valor do p ajustado, assim garantindo a acurácia e ao mesmo tempo aumentar a estringência para DEGs. O diagrama de Venn (**Fig. 21**) mostra que há 336 ocorrências de expressão significativa na soma de todos os contrastes. Dessas, 68 genes são compartilhados entre os contrastes HJ vs AC e

HJ vs NT. É interessante observar que a interseção entre todos os 3 contrastes, não contém nenhum gene compartilhado, indicando que nenhum dos DEGs com $\log_2FC > |1.5|$ sofria da influência do solvente, e que o resultado era apenas do efeito de HJ propriamente dito.

Figura 21- Diagrama de Venn dos contrastes.

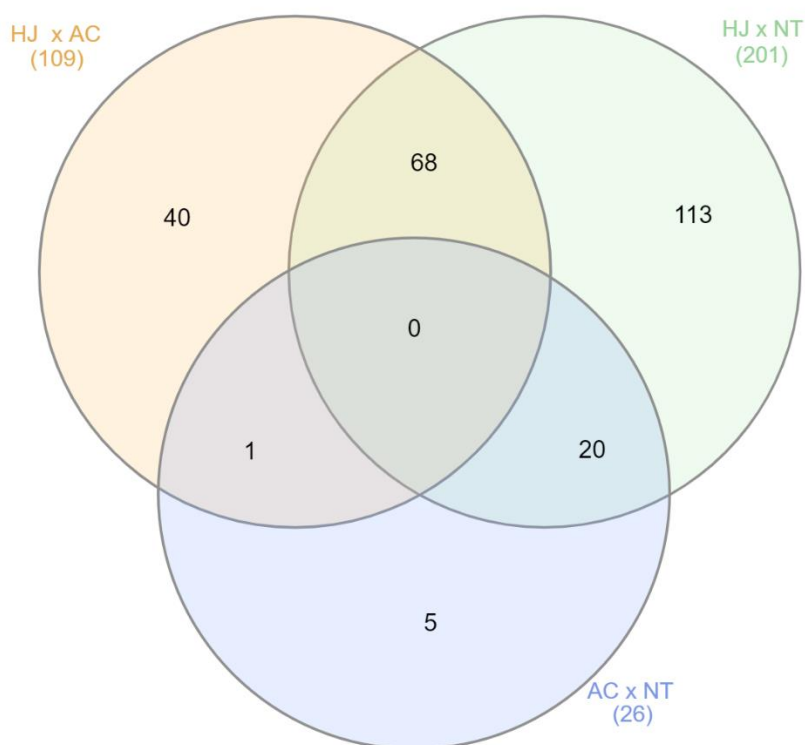


Figura 21: Diagrama de Venn representando DEGs em cada contraste e os genes compartilhados entre os contrastes nas suas respectivas interseções.

Consideraremos, então, os 68 genes compartilhados dos contrastes do tratamento HJ em relação aos grupos controle como os genes de maior interesse para análise mais aprofundada. Separaremos esses genes em duas listas, uma contendo 41 alvos já anotados no genoma (**Tabela 4**) e outra com 27 genes ainda não caracterizados ou que não são codificadores de proteína (**Tabela 5**). Nessas tabelas, os genes com \log_2FC positivo (*up-regulados*) estão discriminados na cor azul e os genes regulados negativamente, em vermelho.

Tabela 4- Lista de GDEs representando genes com genômica bem anotados.

Nome	Gene Symbol	log2FoldChange	
		HJ vs AC	HJ vs NT
methyl farnesoate epoxidase (CYP)	LOC551179	1.763	1.523
leucine-rich repeat-containing protein 58	LOC411291	1.549	1.56
protein trapped in endoderm-1	LOC725008	1.977	1.563
progesterin and adipoQ receptor family member 3	LOC408805	1.548	1.57
probable serine/threonine-protein kinase	LOC726914	1.714	1.585
protein couch potato	LOC408915	1.979	1.717
eyegone	Eyg	1.835	1.738
juvenile hormone acid O-methyltransferase	LOC724216	2.246	1.758
tubulin alpha chain	LOC410614	2.454	1.792
tetraspanin-9	LOC410821	2.107	1.793
mitochondrial amidoxime-reducing component 1	LOC100577026	2.099	1.873
CCAAT/enhancer-binding protein	LOC411207	2.65	2.124
RIB43A-like with coiled-coils protein 1	LOC724507	2.243	2.181
bifunctional purine biosynthesis protein PURH	LOC412467	1.754	2.187
synaptic vesicle glycoprotein 2B	LOC412941	1.972	2.228
phosphoenolpyruvate carboxykinase	LOC412843	2.114	2.239
4-coumarate--CoA ligase 1	LOC726040	2.509	2.246
protein lethal(2)essential for life	LOC412197	2.664	2.395
kruppel homolog 1	Kr-h1	2.521	2.411
protein sprint	LOC727000	2.387	2.436
yellow-y	Y-y	2.535	2.546
protein mesh	LOC725498	2.111	2.874
zinc finger protein 628-like	LOC102654975	4.808	3.145
heat shock protein Hsp70Ab-like	LOC410620	3.29	3.156
cytochrome P450 4c3	LOC410620	4.103	3.823
zinc finger protein chinmo	LOC551086	2.841	3.851
D-3-Phosphoglycerate dehydrogenase	LOC725967	3.785	4.412
cuticular protein CPF1	CPF1	-5.02	-6.262
cuticular protein 16	CPR16	-5.919	-6.171
extensin	LOC725547	-4.343	-5.076
PI-PLC X domain-containing protein 1-like	LOC101664701	-4.133	-4.306
NGFI-A-binding protein homolog	LOC552530	-2.122	-2.951
protein drumstick	LOC724961	-2.289	-2.705
toll-like receptor Tollo	LOC410231	-2.066	-2.437
mucin-5AC	LOC551920	-2.39	-2.235
nose resistant to fluoxetine protein 6	LOC410976	-2.304	-2.021
clavesin-2	LOC552447	-1.539	-1.789
ABC transporter G family member 20	LOC724865	-1.734	-1.777
protein Skeletor, isoforms B/C	LOC100577783	-1.88	-1.774
microtubule-associated protein 2	LOC409539	-1.755	-1.626

obscurin	LOC408830	-1.898	-1.595
----------	-----------	--------	--------

Tabela 5- Lista de GDEs genômicamente não caracterizados como codificadores de proteína.

Gene Symbol	log2FoldChange		TIPO	GENE ID	BeeBase
	HJ vs AC	HJ vs NT			
LOC408463	1.766	1.757	protein coding	408463	GB54151
LOC411888	1.677	1.764	protein coding	411888	GB43983
Mir3759	2.284	1.92	ncRNA	100629078	
LOC552101	1.984	1.927	protein coding	552101	GB55356
LOC100577237	2.838	1.935	protein coding	100577237	GB44697
LOC113219378	1.853	1.951	rRNA		
LOC100576880	1.704	1.989	ncRNA	100576880	GB41833
LOC100578444	2.287	2.301	ncRNA	100578444	-
LOC100578666	2.567	2.414	protein coding	100578666	-
LOC102655088	1.518	5.417	ncRNA	102655088	-
LOC408874	2.436	2.612	protein coding	408874	GB53562
LOC100577537	4.284	2.935	protein coding	100577537	GB46629
LOC100577043	3.279	2.969	protein coding	100577043	GB49262
LOC113219382	2.763	3.257	rRNA	113219382	-
LOC551089	4.954	3.759	protein coding	551089	GB48173
LOC724275	6.795	4.981	protein coding	724275	GB43418
LOC100576529	5.487	5.365	protein coding	100576529	GB50066
LOC725164	-3.796	-4.113	protein coding	725164	GB50828
LOC100577680	-3.715	-4.093	protein coding	100577680	GB51419
LOC725273	-2.246	-3.262	protein coding	725273	GB49260
LOC100579026	-2.443	-2.649	protein coding	100579026	-
LOC413427	-1.976	-2.427	protein coding	413427	GB43145
LOC413369	-2.12	-1.981	protein coding	413369	GB40203
LOC724385	-1.824	-1.847	protein coding	724385	GB52321
LOC409759	-1.796	-1.778	protein coding	409759	GB43123
LOC551170	-1.732	-1.599	protein coding	551170	GB55781
LOC725964	-1.637	-1.519	protein coding	725964	GB52144

7. DISCUSSÃO

7.1 Perfis de expressão gênica

A partir das listas obtidas, voltamos a atenção para cada GDE individualmente, afim de encontrar alguma possível ligação entre o tratamento com HJ e sua possível influência no metabolismo da larva. Para tal utilizamos os bancos de dados *KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes)* e os termos de *Gene Ontology (GO)* da plataforma UniProt. Desta forma foi possível separar os genes em grupos de funcionalidade para interpretação geral dos perfis de expressão.

7.1.2 Biossíntese de HJ

Entre os GDEs, três possuem relação muito estreita com o HJ. Além do já mencionado *Kr-h1*, que valida nosso tratamento como gene de resposta imediata, também encontramos os genes *methyl farnesoate epoxidase (MFE)* e *juvenile hormone O-metiltransferase (JHAMT)*, genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese do HJ (**Fig. 22**). Essas enzimas atuam em substratos precursores imediatos do HJ, essenciais na produção do mesmo nos *corpora allata* (GOODMAN; CUSSON, 2012). Nossos resultados mostram que os três genes estão *up-regulados*, indicando uma possível retroalimentação da via biossintética a partir da presença de HJ nessa fase larval.

Figura 22- Representação esquemática da biossíntese de HJ em insetos.

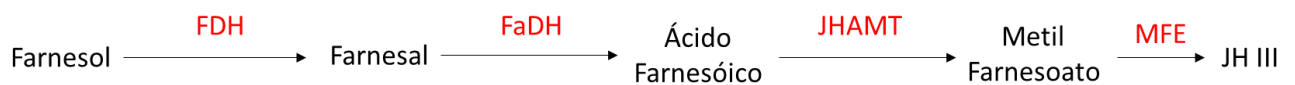


Figura 22: A via de biossíntese de HJ. Este esquema representa apenas o ramo específico da biossíntese de HJ. Na cor vermelha estão representadas as enzimas envolvidas no processo com as suas abreviações: FDH, farnesol desidrogenase; FaDH, farnesal desidrogenase; JHAMT, hormônio juvenil metil transferase; MFE, metil farnesoato epoxidase.

Apesar do fato de os *corpora allata* serem o tecido exclusivo da biossíntese completo de HJ (GOODMAN; CUSSON, 2012), pela restrição exclusiva da expressão de genes como o codificador da HJ epoxidase, último passo na biossíntese, inclusive em abelhas (BOMTORIN et al., 2014), é interessante notar que alguns dos genes da biossíntese de HJ estejam regulados

em resposta ao HJ também no corpo gorduroso. Há duas hipóteses possíveis, que estes genes estejam envolvidos em outras vias de síntese de derivados de farnesol, ou que produzam e secretam para hemolinfa precursores da biossíntese de HJ que possam ser disponibilizadas para uso nos *corpora allata*.

7.1.3 Genes codificadores de enzimas

Entre os genes elencados na lista, há vários codificando enzimas tais como: *Probable serine/threonine-protein kinase*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)*, *4-coumarat-CoA ligase1 (4CL1)*, *cytochrome P450 4c3 (CYP4c3)* e *D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3PGDH)*, onde apenas o último é regulado negativamente.

O gene *Probable serine/threonine-protein kinase* é ortólogo do gene *Sox 14* em *D. melanogaster*, onde desempenha papel importante na muda e metamorfose. Tem uma íntima relação com 20-hidroxiecdisona (20E), hormônio que atua dinamicamente com o HJ regulando os processos de muda. O gene *Sox 14* é necessário na produção adequada do 20E e na resposta transcricional a esse hormônio (RITTER; BECKSTEAD, 2010). A *up-regulação* desse gene é especificamente importante no último estágio larval, na preparação para a fase prepupal/pupal, onde em condições normais a produção de HJ nos CA cessa e, na ausência de HJ, ecdisona começa a desempenhar a função metamórfica (RIDDIFORD, 1994).

O gene *PEPCK* codifica uma enzima muito importante nas vias de sensoriamento de nutrientes. Esta enzima é uma das principais atuantes no processo de gliconeogênese, regulado por *FoxO*. Em mamíferos, *PEPCK* catalisa a formação de fosfoenolpiruvato momentos antes da liberação de glicose no sangue (Para revisão, ver GROSS *et. al*, 2009). Experimentos em *Drosophila* sugerem que administração exógena de JH-III pode induzir a expressão da *PEPCK* (BECKSTEAD; LAM; THUMMEL, 2007).

Semelhantemente, o gene *4CL1*, com pouca literatura disponível para funções em animais, provavelmente possui relação com as vias que regulam *FoxO* e o metabolismo, segundo a base de dados KEGG.

O gene *3PGDH* codifica uma enzima que atua na oxidação reversível no primeiro passo da via de biossíntese de L-serina a partir de D-3-fosfoglicerato. Este aminoácido é importante

pois é o precursor de um grande número de metabólitos celulares essenciais, e a deficiência em 3PGDH pode levar a sérios defeitos metabólicos no sistema nervoso (GRANT, 2018). Curiosamente, esse é o único gene do grupo de enzimas que se encontra *down-regulado*.

O gene *CYP4c3* codifica uma enzima citocromo P450. Os P450s são uma superfamília de enzimas heme-tiolato com ampla variedade de funções em insetos, desde o metabolismo de compostos químicos até síntese e degradação de hormônios e ecdisteroides (FEYEREISEN, 1999). Esses processos bioquímicos garantem características essenciais, como por exemplo resistência a inseticidas (LIEN *et al.*, 2019), habilidade de degradar e sintetizar sinais químicos como feromônios e hidrocarbonos cuticulares (MACLEAN *et. al.*, 2018; WOJTASEK e LEAL, 1999). Em *A. mellifera*, as enzimas P450 foram associadas com detoxificação de toxinas (NIU *et al.*, 2011) e síntese de feromônios nas glândulas mandibulares (WU *et. al*, 2017).

7.1.4 Componentes de membrana

Segundo os dados obtidos nos termos de GO, encontramos 4 genes relacionados com a composição estrutural da membrana. Esses são: *Protein Trapped in endoderm-1 (Tre-1)*, *mitochondrial amidoxime-reducing component 1 (mARC1)*, *CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP1)* e *mucin-5AC*.

O gene *Tre1* é relacionado com processos de migração e morte celular programada em células germinativas de *Drosophila*. Segundo Kunwar e colaboradores (2003), *Tre1* codificaria um receptor de proteína G com uma função ativa nos passos iniciais de migração celular transepitelial. Esses processos são componentes essenciais em fases de desenvolvimento embrionário e larval (COFFMAN *et al.*, 2002; KUNWAR *et al.*, 2003). O fato deste gene se encontrar *up-regulado* por HJ em larvas de *A. mellifera* nesta fase de desenvolvimento pode ser importante pois é neste momento que se encontrou a presença de morte celular programada em ovários de operárias (HARTFELDER; STEINBRÜCK, 1997; CAPELLA; HARTFELDER, 1998). Embora este não seja o tecido alvo do estudo, o corpo gorduroso é o centro metabólico das larvas.

O gene *mARC* codifica para uma enzima de molibdênio em mamíferos que tem sua principal função no metabolismo de n-redução de substâncias e ácidos hidroaxâmicos (GINSEL *et al.*, 2018). Em pacientes é sugerido como fator protetivo de doenças de fígado (EMDIN *et*

al., 2019) e é descrito também como uma proteína da membrana externa das mitocôndrias em humanos (KLEIN *et al.*, 2012). É interessante observar a aparência deste gene como GDE em nossas amostras, primeiramente por se tratar de um tecido envolvido com o metabolismo central das larvas. Talvez neste momento, a expressão regulada positivamente deste gene seja um indício da tentativa de metabolizar o excesso de HJ presente no organismo ou dos produtos secundários produzidos a partir de sua ação nos tecidos. Também podemos hipotetizar que sua ação como proteína de membrana mitocondrial tenha relação com a regulação subcelular destas organelas, que inicialmente chamaram a atenção do nosso projeto.

O gene *C/EBP1* codifica uma proteína de uma família de fatores de transcrição altamente conservados, envolvidos na dimerização e ligação à DNA, podendo também ser reguladores de diferenciação celular, crescimento, sobrevivência e inflamação (MILLER *et. al.*, 2003), com ações centrais também no metabolismo e regulação no metabolismo energético (RAMJI; FOKA, 2002). Interessantemente, ratos com deficiência de *C/EBP α* , proteína da mesma família, morrem logo após o nascimento devido à redução da expressão de síntese de glicogênio e a diminuição dos níveis de enzimas de gliconeogênese, como por exemplo o já mencionado *PEPCK* (WANG *et al.*, 1995). Em nossas amostras, o gene *C/EBP1* encontra-se com sua expressão regulada positivamente, o que é interessante considerando a sua possível relação com a enzima *PEPCK* (também positiva) em um momento onde o metabolismo da larva está mais ativo.

Desse grupo, o único gene regulado negativamente é o *mucin-5AC*, que codifica glicoproteínas de mucina, importantes na formação de muco (VOYNOW; RUBIN, 2009). O que chama atenção nesse gene, no entanto, é sua relação próxima com a via de sinalização EGFR, já mencionado na Introdução nesta dissertação. Em humanos, estudos com sistema respiratório, principalmente com doenças de pulmão e vias aéreas, sugerem que estímulos variados ativam a via EGFR que, por sua vez, regula a expressão positiva de *mucin-5AC* e a produção de muco. O fato deste gene se encontrar menos expresso em nossos dados é importante pois corrobora com dados anteriores de nosso grupo que indicam que EGFR é menos expresso em larvas de rainha (HARTFELDER *et al.*, 2015). Neste caso, sendo parte de uma via dependente de EGFR, faz sentido que *mucin-5AC* seja menos expresso também em larvas tratadas com HJ uma vez que o hormônio estimularia a formação de larvas de rainha.

7.1.5 Genes relacionados com a ligação de ácidos nucleicos

A partir dos dados Gene Ontology agrupamos os genes que foram identificados com termos relacionados à ligação de ácidos nucleicos, seja DNA, RNA, ou ácidos nucleicos em geral. Nestes temos os genes *Protein couch-potato (CPO)*, *RIB43A-like with coiled-coils protein 1*, *protein sprint* e o *Toll-like receptor (Tollo)*. Dos quatro genes, apenas *Tollo* possui o Log2FC negativo.

O gene *CPO* foi descrito com este nome pois sua ausência em *Drosophila* causa hipoatividade em adultos. Possivelmente, essa relação se dá por conta de sua ação em precursores de neurônios e suas células filhas no sistema nervoso periférico embrionário (BELLEN *et al.*, 1992). Essa proteína de ligação de RNA também atua em situações de mudança climática e, conseqüentemente, diapausa reprodutiva (SCHMIDT *et al.*, 2008; BEHRMAN, KAWECKI e SCHMIDT, 2018).

Embora tenha sido agrupado pelo termo de GO na categoria de genes de ligação de ácidos nucleicos, para o gene *RIB43A-like with coiled-coils protein 1* não se encontra informações o suficiente na literatura para uma descrição detalhada e uma possível relação com o objeto de nosso estudo.

O gene *sprint* foi identificado em *Drosophila* como um homólogo de proteína RIN1, capaz de se ligar e inibir a ativação de via RAS. A GTPase-Ras é fundamental na regulação de crescimento e diferenciação em larvas de *Drosophila* (SZABÓ; JÉKELY; RØRTH, 2001).

A família de receptores Toll-like é envolvida com reconhecimento de patógenos pelo sistema imune, não apenas ativando o sistema inato, mas também atua no desenvolvimento de imunidade adquirida antígeno-específico (BARTON e MEDZHITOV, 2003; AKIRA e TAKEDA, 2004). A proteína *Tollo*, por sua vez, foi estudada em *Drosophila* e mostra uma relação com a expressão de glicanos, e é encontrada expressa por células ectodermis que circundam neurônios em diferenciação (SEPPO *et al.*, 2003).

7.1.6 Genes relacionados com proteínas cuticulares

O gene *Cuticular protein CPF1*, descrito em *Anopheles gambiae*, é uma proteína cuticular presente em muitos insetos, estando também expresso em abelhas melíferas.

Sugere-se que esta proteína seja um dos principais componentes da camada externa da cutícula pupal ou da cutícula adulta-farata, imediatamente antes de um adulto emergir (TOGAWA *et al.*, 2007). Interessantemente, em nossos dados esse gene se encontra regulado negativamente de forma muito expressiva, corroborando com o fato de o HJ ser um repressor universal da metamorfose (JINDRA; PALLI; RIDDIFORD, 2013). Semelhantemente, o gene cuticular *Protein 16* também se encontra regulado negativamente após a administração de HJ, indicando que a administração de HJ exógeno estaria reprimindo a expressão de proteínas cuticulares nas larvas L5F2, possivelmente através da dinâmica regulatória de 20E (APPLE; FRISTROM, 1991).

7.1.7 Genes tipo *Zinc-finger*

Proteínas Zinc-finger são um grupo de proteínas muito abundantes nos genomas de eucariotos. Dentre o diverso leque de funções inclui-se reconhecimento de DNA, ativação transcricional, regulação de apoptose, ligação de lipídio entre outros (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001).

Associada ao desenvolvimento pós-embrionário do intestino, a proteína Drumstick é um fator de transcrição putativo do tipo *Zinc-finger* (GREEN *et al.*, 2002). Sua expressão está relacionada ao alongamento de regiões do intestino bem como a orientação celular (GREEN *et al.*, 2002). No contexto de diferenciação de castas a sua função ainda é desconhecida e em nosso experimento o HJ reprimiu a expressão deste gene. Assim, hipotetizamos que o mesmo possua funções relacionadas ao desenvolvimento do intestino de operárias, o qual deve ser, na metamorfose, apropriado para hábitos alimentares e comportamentais da vida adulta. Entretanto, para o gene *zinc finger protein 628-like* há poucas informações disponíveis, e sua função ainda é incerta.

O gene *Chinmo* (*Chronologically inappropriate morphogenesis*), codificador da proteína tipo BTB *Zinc-finger*, possui relação com linhagens neuronais em *Drosophila*, e sua expressão pode ter relação com a identidade temporal neuronal no desenvolvimento pós-embriônico do cérebro (ZHU *et al.*, 2006). O que chama atenção na expressão desse gene em nossos resultados é a sua relação também com o hormônio ecdisona (MARCHETTI; TAVOSANIS, 2017). O gene *chimno* atua upstream da sinalização de ecdisona para promover o destino das

linhagens neuronais, regulando a expressão de determinados variantes de receptores do hormônio. Ainda que o tecido estudado não seja nervoso, sua expressão positiva em nossos resultados se mostra interessante por considerar que, ao se aproximar da fase pupal, o ecdisona terá seus títulos elevados na larva para se preparar para a muda (RACHINSKY et al., 1990).

O gene *NGFI-A* (Também chamado de *Egr-1*), um fator de transcrição tipo *zinc-finger*, pode ser estimulado por diferentes fatores, como fatores de crescimento, e desempenha um importante papel na diferenciação celular (GASHLER; SUKHATME, 1995). Sua função pode estar relacionada com morte celular programada e com outros eventos relacionados à câncer (SVAREN et al., 1996).

7.1.8 Genes relacionados ao desenvolvimento e função do intestino

O gene *mesh*, cuja expressão é maior em larvas tratadas com HJ, codifica uma proteína relacionada à adesão celular, e sua localização celular está restrita à membrana plasmática. Essa proteína auxilia na criação de poros entre células do epitélio de invertebrados, facilitando a difusão de solutos entre células conectadas (IZUMI; YANAGIHASHI; FURUSE, 2012). Além disso, possui importante papel no desenvolvimento correto do intestino e dos túbulos de Malpighi, dois tecidos ligados à absorção e excreção, respectivamente, de compostos em insetos (IZUMI; YANAGIHASHI; FURUSE, 2012; IZUMI et al., 2016). Sua função em *A. mellifera* ainda não é conhecida, porém, genes relacionados à processos de adesão celulares já foram previamente observados como sendo diferencialmente expressos ao se comparar larvas de rainhas e operárias (SANTOS; HARTFELDER, 2015). Ao consultar as bases de dados em termos de GO, essa proteína é relacionada com comportamento de cópula dos machos e biossíntese de melanina. Assim, é possível que o HJ induza nas larvas de rainha a expressão dessa proteína para aumentar a eficiência na troca de nutrientes/excretas com o meio ambiente.

Uma outra proteína encontrada altamente expressa no intestino de vários invertebrados e encontrada em nossa lista de GDEs é o *nose resistant to fluoxetine protein 6* (*NRF-6*) (CHOY; THOMAS, 1999). Esse gene, codificador de uma proteína transmembrana funcionalmente associada a processos de absorção e excreção, é mais expressa em larvas de machos quando comparado a larvas de operárias do mesmo estágio de desenvolvimento na

mamangava *Bombus terrestris* (HARRISON; HAMMOND; MALLON, 2015) e em operárias adultas de *A. mellifera* predispostas ao forrageamento (CARDOEN *et al.*, 2011).

7.1.9 Genes relacionados ao complexo de Golgi

O gene *PAQR3* (*progestin and adipoQ receptor Family member 3*) é um membro da superfamília de receptores progestina e adipoQ e codifica uma proteína de membrana ancorada no complexo de Golgi contendo sete hélices transmembranas (FENG *et al.*, 2007). Estudos sugerem que este gene pode estar envolvido com o controle de crescimento e proliferação celular através da regulação pela via EGFR (CAO *et al.*, 2019) e também pode ter relação com a fosforilação de FoxO1 (CHEN *et al.*, 2019). Ambas vias podem estar sofrendo modulação a partir desse gene, já que o HJ estimulou a sua expressão.

Encontrada em vesículas do endossomo e no complexo de Golgi (KATOH *et al.*, 2009), a proteína clavesin-2 é uma ligadora de lipídios, recentemente encontrada como altamente correlacionada com atividade de forrageamento de abelhas (MA; RANGEL; GROZINGER, 2019).

7.1.10 Genes associados com microtúbulos

Proteínas associadas a microtúbulos como a MAP2 fazem parte de uma família de proteínas. Associadas aos microtúbulos, suas funções variam, mas empenham um papel crítico dentro das células, como na organização do fuso mitótico, por exemplo (GOODSON; JONASSON, 2018). O gene *MAP2* vêm sendo associado com doenças neuronais por ser um estabilizador dos microtúbulos localizados em axônios e dendritos que desempenham um papel importante na organização estrutural das células nervosas (GOODSON; JONASSON, 2018). Da mesma forma, estudos indicam que a regulação negativa da MAP2 inibe significativamente a viabilidade e migração celular e pode induzir apoptose em tecido nervoso humano (YANG; XU; ZHENG, 2019).

A proteína Skeletor é associada com a ligação com cromossomos na interfase e define uma estrutura fusiforme que irá fornecer o suporte que estabiliza os microtúbulos (WALKER *et al.*, 2000). Segundo estes autores, a caracterização da proteína Skeletor representa a

primeira evidencia molecular da existência de um fuso pré-mitótico dentro do núcleo, antes da formação do fuso propriamente dito por microtúbulos. Em insetos, essa proteína é encontrada em espermatócitos, associada com a formação do fuso e com microtúbulos (FABIAN *et al.*, 2007).

A família de genes codificadores de tubulina é dividida em três subfamílias altamente conservadas: alfa-, beta- e gama-tubulina, cada um definido por sequência conservada e com grande distribuição entre os eucariotos (KEELING; DOOLITTLE, 1996). Das três variantes, alfa e beta-tubulinas são os mais abundantes nas células eucarióticas. Heterodímeros dessas duas proteínas são os constituintes primários dos microtúbulos, que compõem cílios, flagelos, citoesqueleto e fuso mitótico (KEELING; DOOLITTLE, 1996). O gene *tubulin alpha chain*, encontrado como GDE, especificamente, no entanto, não possui muitas informações na literatura. Nos bancos de dados, apresenta nos termos de GO função de metil transferase.

Em nossos dados, os genes *MAP2* e *Skeletor* estão regulados negativamente, enquanto *Tubulin-alpha chain* encontra-se mais expresso na presença de HJ. Possivelmente, há uma relação com a dinâmica da formação do fuso mitótico. Não é possível dizer, no entanto, se o HJ inibe ou estimula a produção do mesmo, mas há uma sugestiva dinâmica entre as vias em que o hormônio atua em relação à essas proteínas.

7.1.11 Outros genes com funções conhecidas

Um dos DEGs foi o *yellow-y*, um membro da família de genes *yellow* que se encontra amplamente disperso em artrópodos (DRAPEAU *et al.*, 2006). Mutantes da mosca *Drosophila* para esse gene apresentam fenótipo amarelado e com baixo sucesso reprodutivo no caso dos machos, uma vez que possuem dificuldades em agarrar as fêmeas durante a cópula (MASSEY *et al.*, 2019). Interessantemente, no gênero *Apis* a família Yellow sofreu múltiplas duplicações gênicas, contendo inclusive o cluster das Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) (DRAPEAU *et al.*, 2006), principais componentes proteicos da geleia real. Ainda com papel bastante controverso (MALESZKA, 2018), as MRJPs parecem desempenhar papéis críticos durante o desenvolvimento larval de abelhas melíferas. Por exemplo, inicialmente foi demonstrado que a MRJP1 induzia a diferenciação de rainhas pela via de EGFR, um mecanismo que em partes era dependente da metilação diferencial desse gene (KAMAKURA, 2011). No entanto, esses

dados não foram reproduzidos por outros pesquisadores, os quais demonstraram depois que a MRJP1 além de não ativar a via EGFR, sua função primária provavelmente é a de criar uma malha proteica que prenda as larvas de rainhas à geleia real uma vez que a orientação das realeiras é na vertical, apontado para baixo (BUTTSTEDT *et al.*, 2016, 2018). Ainda foi demonstrado que o gene EGFR não é metilado, contradizendo novamente os resultados apresentados por Kamakura (2011) (KUCHARSKI; FORET; MALESZKA, 2015). Recentemente foi demonstrado que a MRJP3 é uma proteína ligadora de RNAs (MAORI *et al.*, 2019), sugerindo assim um papel regulatório nos transcritos presentes na geleia real que atuam no desenvolvimento de rainhas (ZHU *et al.*, 2017b). Assim, consideramos que o gene *yellow-y*, cuja expressão é aumentada após o tratamento com HJ e faz parte da família gênica que inclui as MRJP, merece atenção em trabalhos futuros, considerando que o *yellow-y* foi o único dessa família que se apresentou como diretamente regulado pro HJ.

O gene *eyegone (eyg)* está amplamente relacionado com o desenvolvimento e formação do olho através da regulação do gene *Paired Box 6 (Pax6)*, um fator de transcrição altamente conservado que atua não só no olho mas na formação adequada de toda a cabeça do indivíduo adulto e também do sistema nervoso central em *Drosophila* (ZHU *et al.*, 2017). Estudos indicam que *Eyg* está envolvido não somente na formação própria do olho, mas também na segmentação do tórax, sendo expresso na parte anterior do mesotórax (ALDAZ; MORATA; AZPIAZU, 2003). Esse gene, tão importante no desenvolvimento apropriado, encontra-se regulado negativamente em nossos resultados. Em trabalho anterior do nosso grupo (MARCO ANTONIO; HARTFELDER, 2017) investigamos a expressão diferencial de genes relacionados à formação do olho em *A. mellifera*, uma vez que os mesmos apresentam grande diferença entre os sexos e castas.

O gene *tetraspanin 9* codifica uma proteína membro da família TSPAN, já demonstrado como envolvido na agregação de plaquetas e infecções virais (HAINING *et al.*, 2017). Estudos sugerem, também, que esse gene pode atuar no nível de secreção de proteínas associados com metástase tumoral e inibir a proliferação, migração e invasão celular em tecido gástrico humano (LI *et al.*, 2016).

As Heatshock proteins (Hsps) são chaperonas moleculares com variadas funções. Estão relacionadas com condições de stress e mudanças de temperatura (SCHLESINGER, 1990),

prevenindo alterações na estrutura funcional de proteínas susceptíveis nestas condições. Em insetos, as Hsps também estão relacionadas com a diapausa, e situações estressoras como calor, frio, anoxia e superpopulação estimulam a síntese dessas proteínas (KING; MACRAE, 2015). É possível que o HJ exógeno esteja causando uma situação sistêmica de stress nas larvas e, dessa maneira, aumentando a expressão desse gene.

Encontramos também o gene *protein lethal(2)essential for life* como diferencialmente expressa em nossas bibliotecas de RNA-seq. A respectiva proteína é uma chaperona altamente expressa ubiquitadamente durante a embriogênese de *D. melanogaster*, e o seu *knockout* é letal (KURZIK-DUMKE; LOHMANN, 1995). Seu papel está relacionado ao enovelamento correto de proteínas em *Drosophila*. Em *A. mellifera*, esta proteína já foi observada por ser um fator relacionado ao crescimento no desenvolvimento pós-embriônico das larvas (FENG; FANG; LI, 2009; YANG; YANG; WANG, 2017). Sua expressão elevada em larvas tratadas com HJ concorda com a hipótese que ela estaria relacionada as elevadas taxas de metabolismo nas larvas de rainhas quando comparadas com larvas de operárias (SANTOS; ALBERICI; HARTFELDER, 2016b), o que auxiliaria na expansão da capacidade de síntese proteica. Ainda, a maior expressão desta proteína estaria associada à maior longevidade das operárias de inverno (SEEHUUS *et al.*, 2013), as quais sobrevivem durante todo o inverno sem hibernarem.

O gene *Obscurin (Unc-89 em Drosophila)* codifica uma proteína modular grande nos músculos de *Drosophila*. A proteína é relacionada com o bom funcionamento de músculos e, sobretudo, nos músculos indiretos de voo (KATZEMICH *et al.*, 2015). Uma isoforma dessa proteína foi encontrada em larvas da mosca, no entanto, o seu silenciamento não causou nenhum efeito no desenvolvimento (KATZEMICH *et al.*, 2012).

7.1.12 Genes com pouca informação disponível

Para alguns genes listados na Tabela 4, embora caracterizados e com nome, há pouca informação disponível na literatura, e para diversos há informações até contrastantes por conta de siglas que são adotadas e que não eram padronizadas. Dessa lista, podemos destacar os genes *synaptic vesicle glycoprotein 2B* e *PI-PLC X domain-containing protein 1-like*

Já os genes codificadores com denominações *Leucine-rich repeats* representam domínios de ligantes proteicos. São versáteis e encontradas em um grande número de

proteínas com diversas funções, incluindo imunidade inata e desenvolvimento do sistema nervoso (DOLAN *et al.*, 2007). No entanto, para o gene *leucine-rich repeat-containing protein 58* especificamente não encontramos informações o suficiente na literatura.

A proteína bifuncional purine biosynthesis protein PURH está relacionada ao metabolismo de purinas em humanos (CHEONG *et al.*, 2004). Com poucos dados na literatura que possam fornecer pistas sobre seu papel na determinação de castas de *A. mellifera*, especulamos que esse gene possa ser importante durante as divisões celulares no corpo gorduroso, que devem ser mais intensificadas nas rainhas, evidenciado pelo seu tamanho corporal e desenvolvimento mais rápido que das operárias.

Os transportadores ABC são proteínas associadas à membrana, relacionados com a ligação de ATP e mediação atividades de efluxo. Essas proteínas podem também estar associadas com a regulação de células tronco e desempenhar um papel importante na hematopoiese (BUNTING, 2002). O gene *ABCG20*, no entanto, não possui uma caracterização suficiente para que possamos relacioná-lo com o desenvolvimento das larvas de *A. mellifera*.

7.1.13 Genes não caracterizados

Na **Tabela 5** listamos 27 genes, dos quais 17 estão regulados positivamente e 10 negativamente. No entanto, esses genes ainda não foram caracterizados e ficam sem informação molecular/funcional mais específica. Assim, mais estudos são necessários para que esses genes ganhem anotação funcional. É importante chamar atenção para o fato que alguns desses genes apresentaram níveis de expressão diferencial bem mais altos que os genes de função conhecida, assim merecendo atenção especial.

8. CONCLUSÕES

Na base dos resultados podemos concluir com certa confiabilidade:

1) que o hormônio juvenil aparentemente não age diretamente como regulador de genes envolvidos no metabolismo oxidativo, conforme evidenciado nas respostas imediatas dos respectivos genes candidatos ao tratamento com o hormônio. Isso difere do observado da expressão destes genes na situação do desenvolvimento natural nas duas castas (SANTOS *et al.*, 2016), indicando que são regulados por outros sinalizadores, mas não diretamente por HJ.

2) que o HJ também não age diretamente a nível fisiológico nas mitocôndrias, já que nos ensaios de respirometria não houve diferença no consumo de oxigênio.

3) que existe a possibilidade de o HJ causar alteração rápida e transiente na morfologia das mitocôndrias, indicando uma possível ação imediata estressora, seguida por um mecanismo de reparo possivelmente envolvendo o gene *OPA1*.

4) que diversos genes apresentam uma resposta imediata no corpo gorduroso exposto ao HJ. Entre estes genes há grupos funcionais relacionados com a via de biossíntese do próprio hormônio, com a interação HJ e ecdisona, com genes codificando proteínas do metabolismo energético e com possível envolvimento em diversas vias de sinalização de resposta a nutrientes.

5) que para uma porcentagem considerável de transcritos identificados como diferencialmente representados em resposta ao hormônio não há informações funcionais disponíveis. Entretanto, o fato de vários destes genes apresentarem níveis de expressão diferencial bem maiores que os genes de função conhecida deve estimular futuras pesquisas sobre as suas eventuais funções no contexto da diferenciação das castas em *Apis mellifera*.

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature reviews immunology**, v. 4, n. 7, p. 499, 2004.
- ALDAZ, S.; MORATA, G.; AZPIAZU, N. The Pax-homeobox gene *eyegone* is involved in the subdivision of the thorax of *Drosophila*. **Development**, v. 130, n. 18, p. 4473–4482, set. 2003.
- APPLE, R. T.; FRISTROM, J. W. 20-Hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates, transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes. **Developmental Biology**, v. 146, n. 2, p. 569–582, 1991.
- BECKSTEAD, R. B.; LAM, G.; THUMMEL, C. S. Specific transcriptional responses to juvenile hormone and ecdysone in *Drosophila*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 6, p. 570–578, 2007.
- BELLEN, H. J. et al. The *Drosophila* couch potato protein is expressed in nuclei of peripheral neuronal precursors and shows homology to RNA-binding proteins. **Genes and Development**, v. 6, n. 11, p. 2125–2136, 1992.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, ago. 2014.
- BOMTORIN, A. D. et al. Juvenile Hormone Biosynthesis Gene Expression in the corpora allata of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Female Castes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86923, 29 jan. 2014.
- BOOMSMA, J. J.; GAWNE, R. Superorganismality and caste differentiation as points of no return: how the major evolutionary transitions were lost in translation. **Biological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 28–54, 1 fev. 2018.
- BUNTING, K. D. ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells. **STEM CELLS**, v. 20, n. 1, p. 11–20, 1 jan. 2002.
- BUTTSTEDT, A. et al. Royalactin is not a royal making of a queen. **Nature**, v. 537, n. 7621, p. E10–E12, 2016.
- BUTTSTEDT, A. et al. How Honeybees Defy Gravity with Royal Jelly to Raise Queens. **Current Biology**, 2018.
- CAO, Q. et al. PAQR3 suppresses the growth of non-small cell lung cancer cells via modulation of EGFR-mediated autophagy. **Autophagy**, 2019.
- CAPELLA, I. C. S.; HARTFELDER, K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 5–6, p. 385–391, maio 1998.
- CARDOEN, D. et al. Genome-wide analysis of alternative reproductive phenotypes in honeybee workers. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 19, p. 4070–4084, out. 2011.
- CHEN, L. et al. PAQR3 regulates phosphorylation of FoxO1 in insulin-resistant HepG2 cells via NF- κ B signaling pathway. **Experimental Cell Research**, v. 381, n. 2, p. 301–310, 15 ago. 2019.
- CHEONG, C. G. et al. Crystal Structures of Human Bifunctional Enzyme Aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleotide Transformylase/IMP Cyclohydrolase in Complex with Potent Sulfonyl-containing Antifolates. **Journal of Biological Chemistry**, 2004.
- CHOY, R. K. M.; THOMAS, J. H. Fluoxetine-resistant mutants in *C. elegans* define a novel family of

transmembrane proteins. **Molecular cell**, v. 4, n. 2, p. 143-152, 1999.

COFFMAN, C. R. et al. Identification of X-linked genes required for migration and programmed cell death of *Drosophila melanogaster* germ cells. **Genetics**, v. 162, n. 1, p. 273–84, set. 2002.

CRAILSHEIM, K. et al. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 37–41, 2013.

DE AZEVEDO, S. V.; HARTFELDER, K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 6, p. 1064–1071, 2008.

DE AZEVEDO, S. V. et al. Differential expression of hypoxia pathway genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 1, p. 38–45, 2011.

DEKANTY, A. et al. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF- α /Sima. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 23, p. 5431–41, 2005.

DOLAN, J. et al. The extracellular Leucine-Rich Repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 320, 2007.

DOMINY, J. E.; PUIGSERVER, P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, jul. 2013.

DRAPEAU, M. D. et al. Evolution of the Yellow / Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Research**, p. 1385–1394, 2006.

EMDIN, C. A. et al. A missense variant in Mitochondrial Amidoxime Reducing Component 1 gene and protection against liver disease. **bioRxiv**, p. 594523, 1 jan. 2019.

FABIAN, L. et al. Titin in insect spermatocyte spindle fibers associates with microtubules, actin, myosin and the matrix proteins skeletor, megator and chromator. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 13, p. 2190–2204, 1 jul. 2007.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, 2009.

FLATT, T. et al. Life-history evolution and the polyphenic regulation of somatic maintenance and survival. **The Quarterly review of biology**, v. 88, n. 3, p. 185-218, 2013.

GASHLER, A.; SUKHATME, V. P. Early Growth Response Protein 1 (Egr-1): Prototype of a Zinc-finger Family of Transcription Factors. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 50, n. C, p. 191–224, 1995.

GINSEL, C. et al. The Involvement of the Mitochondrial Amidoxime Reducing Component (mARC) in the Reductive Metabolism of Hydroxamic Acids. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 46, n. 10, p. 1396 LP – 1402, 1 out. 2018.

GOODMAN, W. G.; CUSSON, M. The Juvenile Hormones. **Insect Endocrinology**, p. 310–365, 1 jan. 2012.

GOODSON, H. V.; JONASSON, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 6, p. a022608, 2018..

GRANT, G. D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 5, p. 110, 2018.

GREEN, R. B. et al. Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. **Development**, 2002.

HARRISON, M. C.; HAMMOND, R. L.; MALLON, E. B. Reproductive workers show queenlike gene expression in an intermediately eusocial insect, the buff-tailed bumble bee *Bombus terrestris*. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 12, p. 3043–3063, jun. 2015.

HARTFELDER, K. et al. Old Threads Make New Tapestry—Rewiring of Signalling Pathways Underlies Caste Phenotypic Plasticity in the Honey Bee, *Apis mellifera* L. In: **Advances in Insect Physiology**. Academic Press, 2015. p. 1-36.

HARTFELDER, K.; EMLEN, D. J. Endocrine Control of Insect Polyphenism. **Insect Endocrinology**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 464–522.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current topics in developmental biology**, 1998. .

HARTFELDER, K.; STEINBRÜCK, G. Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 31, n. 1–3, p. 237–250, 1997.

HUBER, W. et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. **Nature methods**, v. 12, n. 2, p. 115–121, fev. 2015.

IZUMI, Y. et al. A tetraspanin regulates septate junction formation in *Drosophila* midgut. **Journal of Cell Science**, 2016.

IZUMI, Y.; YANAGIHASHI, Y.; FURUSE, M. A novel protein complex, Mesh-Ssk, is required for septate junction formation in the *Drosophila* midgut. **Journal of Cell Science**, 2012.

JINDRA, M.; BELLÉS, X.; SHINODA, T. Molecular basis of juvenile hormone signaling. **Current Opinion in Insect Science**, v. 11, p. 39-46, 2015. SHUEL, R. W.; DIXON, S. E. The early establishment of dimorphism in the female honeybee, *Apis mellifera* L. **Insectes Sociaux**, v. 7, n. 3, p. 265–282, 1960.

JINDRA, M.; PALLI, S. R.; RIDDIFORD, L. M. The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 181–204, 2013.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 478–483, 2011.

KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. Database issue, p. D353–D361, 4 jan. 2017.

KATOH, Y. et al. The clavesin family, neuron-specific lipid-and clathrin-binding sec14 proteins regulating lysosomal morphology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27646–27654, 2 out. 2009.

KATZEMICH, A. et al. The function of the M-line protein obscurin in controlling the symmetry of the sarcomere in the flight muscle of *Drosophila*. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 14, p. 3367–3379, 15 jul. 2012.

KATZEMICH, A. et al. Binding partners of the kinase domains in *Drosophila* obscurin and their effect on the structure of the flight muscle. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 18, p. 3386–3397, 2015.

KEELING, P. J.; DOOLITTLE, W. F. Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 10, p. 1297–1305, 1 dez. 1996.

- KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, v. 12, n. 4, p. 357–360, abr. 2015.
- KING, A. M.; MACRAE, T. H. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 59–75, 2015.
- KLEIN, J. M. et al. The mitochondrial amidoxime-reducing component (mARC1) is a novel signal-anchored protein of the outer mitochondrial membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42795–42803, 14 dez. 2012.
- KONOPOVA, B.; SMYKAL, V.; JINDRA, M. Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28728, 2011.
- KUCHARSKI, R.; FORET, S.; MALESZKA, R. EGFR gene methylation is not involved in Royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14070, 2015.
- KUNWAR, P. S. et al. Tre1, a G Protein-Coupled Receptor, Directs Transepithelial Migration of Drosophila Germ Cells. **PLoS Biology**, v. 1, n. 3, p. e80, 22 dez. 2003.
- KURZIK-DUMKE, U.; LOHMANN, E. Sequence of the new Drosophila melanogaster small heat-shock-related gene, lethal(2) essential for life [(2) efl], at locus 59F4,5. **Gene**, 1995.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 1, p. 39–46, 1 fev. 2001.
- LAWRENCE, M. *et al.* Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 8, 8 ago. 2013.
- LI, Y. et al. HIF- and Non-HIF-Regulated Hypoxic Responses Require the Estrogen-Related Receptor in Drosophila melanogaster. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, 2013.
- LI, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, ago. 2009.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, 2014.
- LOZANO, J.; BELLES, X. Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. **Scientific reports**, v. 1, p. 163, 2011.
- MA, R.; RANGEL, J.; GROZINGER, C. M. Honey bee (*Apis mellifera*) larval pheromones may regulate gene expression related to foraging task specialization. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 19 jul. 2019.
- MACKERT, A. et al. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. - Expression analysis and functional assays. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 1, p. 33–44, maio 2008.
- MALESZKA, R. Beyond Royalactin and a master inducer explanation of phenotypic plasticity in honey bees. **Communications Biology**, 2018. .
- MAORI, E. et al. A Secreted RNA Binding Protein Forms RNA-Stabilizing Granules in the Honeybee Royal Jelly. **Molecular Cell**, 2019.
- MARCHETTI, G.; TAVOSANIS, G. Steroid Hormone Ecdysone Signaling Specifies Mushroom Body

- Neuron Sequential Fate via Chinmo. **Current Biology**, v. 27, n. 19, p. 3017- 3024.e4, 9 out. 2017.
- MARCO ANTONIO, D. S.; HARTFELDER, K. Toward an Understanding of Divergent Compound Eye Development in Drones and Workers of the Honeybee (*Apis mellifera* L.): A Correlative Analysis of Morphology and Gene Expression. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 328, n. 1–2, p. 139–156, 2017.
- MASSEY, J. H. et al. The yellow gene influences drosophila male mating success through sex comb melanization. **eLife**, 2019.
- MEREZHINSKII, M. F. The role of the hypothalamus in the regulation of metabolism. **Zdravookhranenie Belorussii**, v. 9, p. 24–27, 1963.
- MICHELETTE, E. R. F. et al. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v. 24, p. 431-431, 1993.
- MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Harvard University Press, 1974.
- MILLER, M. et al. Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 15178–15184, 2003.
- MINAKUCHI, C.; ZHOU, X.; RIDDIFORD, L. M. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. **Mechanisms of development**, v. 125, n. 1-2, p. 91-105, 2008.
- MIRTH, Christen Kerry et al. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 19, p. 7018-7023, 2014.
- MUTTI, N. S. et al. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 23, p. 3977–3984, 2011.
- NOWAK, M. A.; TARNITA, C. E.; WILSON, E. O. The evolution of eusociality. **Nature**, 26 ago. 2010. .
- OSANAI, M.; REMBOLD, H. Entwicklungsabhängige mitochondriale Enzymaktivität bei den Kasten der Honigbiene. **BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA**, v. 62, p. 22–31, 1968.
- PATEL, A. et al. The Making of a Queen: TOR Pathway Is a Key Player in Diphenic Caste Development. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. 1–7, 2007.
- PATTEN, D. A. et al. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 22, p. 2676–2691, 18 nov. 2014.
- PUIG, O.; TJIAN, R. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. **Genes & development**, v. 19, n. 20, p. 2435-2446, 2005.
- QUINTANA-CABRERA, R. et al. The cristae modulator Optic atrophy 1 requires mitochondrial ATP synthase oligomers to safeguard mitochondrial function. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- RACHINSKY, A.; HARTFELDER, K. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **General and comparative endocrinology**, v. 79, n. 1, p. 31-38, 1990.
- RAMJI, D. P.; FOKA, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. **Biochemical Journal**, v. 365, n. 3, p. 561–575, 2002.
- REMBOLD, H.; CZOPPELT, C.; RAO, P. J. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, n. 7, 1974.

- RITTER, A. R.; BECKSTEAD, R. B. Sox14 Is required for transcriptional and developmental responses to 20-hydroxyecdysone at the onset of drosophila metamorphosis. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 10, p. 2685–2694, 2010.
- SANTOS, C. G.; HARTFELDER, K. Insights into the dynamics of hind leg development in honey bee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae - A morphology/differential gene expression analysis. **Genetics and Molecular Biology**, 2015.
- SANTOS, D. E.; ALBERICI, L. C.; HARTFELDER, K. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 73, p. 1–11, 2016a.
- SANTOS, D. E.; ALBERICI, L. C.; HARTFELDER, K. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 73, p. 1–11, 2016b.
- SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiological Reviews**, abr. 2008. .
- SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12111-12114, 1990.
- SEEHUUS, S. C. et al. Somatic Maintenance Resources in the Honeybee Worker Fat Body Are Distributed to Withstand the Most Life-Threatening Challenges at Each Life Stage. **PLoS ONE**, 2013.
- SEPPO, A. et al. Induction of neuron-specific glycosylation by Tollo/Toll-8; Toll-like receptor expressed in non-neural cells. **Development**, v. 130, n. 7, p. 1439 LP – 1448, 1 abr. 2003.
- STOJANOVSKI, D. et al. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 7, p. 1201–1210, 1 mar. 2004.
- SVAREN, J. et al. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 7, p. 3545–3553, jul. 1996.
- SZABÓ, K.; JÉKELY, G.; RØRTH, P. Cloning and expression of sprint, a Drosophila homologue of RIN1. **Mechanisms of Development**, v. 101, n. 1–2, p. 259–262, 1 mar. 2001.
- TEN-CATEN, F. *et al.* Internal RNAs overlapping coding sequences can drive the production of alternative proteins in archaea. **RNA biology**, v. 15, n. 8, p. 1119–1132, 2018.
- TENNESSEN, J. M. et al. The Drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 139–148, 2011.
- THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. Database issue, p. D330–D338, 8 jan. 2019.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. Database issue, p. D158–D169, 4 jan. 2017.
- THUMMEL, C. S. Ecdysone-regulated puff genes 2000. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2002.
- TOGAWA, T. et al. CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 7, p. 675–688, 1 jul. 2007.
- VOYNOW, J. A.; RUBIN, B. K. Mucins, Mucus, and Sputum. **Chest**, v. 135, n. 2, p. 505–512, 1 fev. 2009.

- WALKER, D. L. et al. Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 7, p. 1401–1411, 2000.
- WANG, Nai-dy et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. **Science**, v. 269, n. 5227, p. 1108-1112, 1995.
- WANG, Y. et al. Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **The Journal of experimental biology**, v. 216, p. 4347–57, 2013.
- WHEELER, D. E.; BUCK, N. A.; EVANS, J. D. Expression of insulin/insulin-like signalling and TOR pathway genes in honey bee caste determination. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 113–121, 2014.
- WILSON, E. O.; HÖLLDOBLER, B. The superorganism: The beauty, elegance, and strangeness of insect societies. **W. W Norton & Company, New York**, 2009
- WINSTON, M. L. **The biology of the honey bee**. harvard university press, 1991.
- WIRTZ, P.; BEETSMA, J. Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 15, n. 4, p. 517-520, 1972.
- YANG, L.; XU, X.; ZHENG, J. Microtubule-associated protein 2 knockdown sensitizes glioma cells to vincristine treatment. **NeuroReport**, 2019.
- YANG, X. H.; YANG, S. F.; WANG, R. M. Comparative proteomic analysis provides insight into 10-hydroxy-2-decenoic acid biosynthesis in honey bee workers. **Amino Acids**, 2017.
- ZHU, J. et al. *Drosophila* Pax6 promotes development of the entire eye-antennal disc, thereby ensuring proper adult head formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 23, p. 5846–5853, 6 jun. 2017a.
- ZHU, K. et al. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 8, p. e1006946, 2017b.
- ZHU, S. et al. Gradients of the *Drosophila* Chinmo BTB-Zinc Finger Protein Govern Neuronal Temporal Identity. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 409–422, 20 out. 2006.