

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

Perfil de expressão de genes da família MRJP e YELLOW em abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini)

Patrick Douglas De Souza Dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no programa de Pós-graduação em Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

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

Perfil de expressão de genes da família MRJP e YELLOW em abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini)

Patrick Douglas De Souza Dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no programa de Pós-graduação em Entomologia.

Orientadora: Zilá Luz Paulino Simões

RIBEIRÃO PRETO - SP

2020

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.

Souza-Santos, Patrick Douglas de

Perfil de expressão de genes da família MRJP e YELLOW em abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini). Ribeirão Preto, 2020.

76 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Entomologia.

Orientadora: Simões, Zilá Luz Paulino.

1. Abelhas nativas. 2. *Melipona quadrifasciata*. 3. Major Royal Jelly Protein. 4. Cluster YELLOW. 5. Glândulas hipofaríngeas. 6. Filogenia. 7. Sintenia.

Nome: SANTOS, Patrick Douglas de Souza dos

Título: Perfil de expressão de genes da família MRJP e YELLOW em abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências obtido no programa de Pós-graduação em Entomologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

“It is good to have an end to journey toward; but it is the journey that matters, in the end.”

Ursula K. Le Guin, The Left Hand of Darkness

AGRADECIMENTOS

Tudo o que fazemos faz parte de um complexo processo coletivo, nada do que eu fiz eu executei sozinho. A construção do conhecimento é um movimento holístico. Além de nós, as pessoas que passam pelo nosso caminho tornam nossas ações tangíveis e possíveis. A partir disso, devo toda minha gratidão a minha família ao longo da minha jornada até aqui. À minha mãe, Márcia Regina Agostini de Souza e seu companheiro Ewerson dos Santos Amado exemplos de força e resiliência, e aos meus avós, Marlene Agostini de Souza e Luis Moacir da Silva Ferraz. *Omnia vincit amor.*

Aos meus amigos distantes, os “Brothers do Surf” Claudio Dubina Neto, Bruno Teixeira Peixoto, Richardt Dias, Pedro Cocola, Nicolas Kuhn, Lucas Garbeloti e Ricardo Teixeira pela companhia e por serem bons amigos em muitos momentos.

Aos queridos amigos que a biologia me proporcionou conhecer, Pedro Bencke e William Lautert, grato pela companhia e reflexões sobre coisas da vida, o universo e tudo mais.

À minha orientadora e ao meu coorientador da graduação, Betina Blochtein e Charles Fernando dos Santos. Grato por todo incentivo, apoio e confiança enquanto estive no Museu de Ciências e Tecnologia – PUCRS.

Agradeço também à Renata Andrade Cavallari, secretária do Programa de Pós-graduação em Entomologia e também, à Vera Cassia Cicilini de Lucca, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada. Encontrar vocês sempre com disposição para ajudar é motivador.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Entomologia, os “caras do momento” Levi Barros, Felipe Freitas, Daniel Tirapeli, Lucas Henrique pelo apoio, conversas e conhecimentos compartilhados e em especial, Vinicius Lopez pelas discussões epistemológicas e devaneios sobre ciência.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas, Fabiano C. P. Abreu, Fábio O. Barbin, Fernanda A. Dalarmi, Fernanda C. Sanches, Franciene R. Oliveira, Jaqueline E. Batista, Leonardo Nascimento, Lucas T. Agostini, Anete P. Lourenço, Vera L. C. Figueiredo e Maria Oliveira pela companhia e ajuda ao longo desse tempo. E em especial, à Flávia C. P. Freitas, Luana Bataglia, Danielle L. Lucena e Thiago S. Depintor, pessoas cujo a dedicação e disposição para ajudar é admirável e reforçadora.

Aos professores e professoras do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas, Francis de Moraes Franco Nunes e Márcia Maria Gentile Bitondi pelos conhecimentos e reflexões. E também sou muito grato especialmente a minha orientadora Zilá Luz Paulino Simões, pelo apoio, confiança, paciência e principalmente pela sabedoria compartilhada. Além disso, por ser uma pessoa e pesquisadora incrível, com uma energia contagiante, capaz de motivar as pessoas em seu entorno; e parafraseando Henry David Thoreau “*viver em profundidade e sugar todo o tutano do conhecimento*” é estar vivo, e transmitir isso adiante com clareza e amor é permanecer vivo.

Ao curso de Pós-graduação em Entomologia com seus docentes, técnicos e principalmente seus funcionários pois sem a base, não há topo.

E por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Scientia vincet.

RESUMO

As abelhas sem ferrão (Meliponini) possuem um elevado nível de organização social caracterizada por sobreposição de gerações na mesma colônia, cuidado parental e divisão do trabalho reprodutivo entre rainha e operária (castas). Nas abelhas sem ferrão, a diferenciação de castas é disparada pela quantidade de alimento recebida pelas larvas. Nas abelhas do gênero *Melipona*, a composição alélica também desempenha um papel na determinação de castas e pode conferir predisposição genética à larva para se desenvolver em rainha se alimentada com maiores quantidades de alimento (sistema de determinação de castas genético-alimentar). Em *Melipona*, o alimento larval é rico em aminoácidos, lipídeos e proteínas e é essencial para o desenvolvimento das larvas. Nas abelhas *Apis mellifera*, as proteínas que compõem o alimento larval, a geleia real, são sintetizadas pelas glândulas hipofaríngeas. Os genes que codificam tais proteínas são chamados de *Major Royal Jelly Proteins* (MRJP) e em *A. mellifera* estes genes formam um *cluster* no cromossomo 11 composto por 9 genes MRJP flanqueados por genes da família YELLOW. Os genes YELLOW e um gene MRJP estão presentes no genoma de *Melipona quadrifasciata*, mesmo estas não produzindo geleia real. A alta similaridade entre a sequência de aminoácidos das MRJPs e das YELLOWS das diferentes abelhas sugere uma origem evolutiva em comum nesses dois grupos de genes (ou do *cluster*). O principal objetivo deste trabalho foi analisar em fêmeas e machos a expressão dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* nas glândulas hipofaríngeas de *M. quadrifasciata*, em diferentes fases da vida adulta (1, 10 e 22 dias de vida). As sequências dos genes de interesse foram recuperadas dos bancos de dados NCBI e Hymenoptera Mine. Os genes ortólogos foram identificados através do alinhamento das sequências dos genes codificadores de MRJPs e YELLOW de *A. mellifera* contra as sequências gênicas disponíveis de *M. quadrifasciata*. A caracterização desses genes e de seus produtos demonstrou que a quantidade total de aminoácidos, propriedades físico-químicas e predição de sítios de fosforilação constituíam parâmetros capazes de discriminar os componentes desta família. Destacamos também a predição dos sítios de fosforilação nas sequências gênicas codificadoras das quinases de EGFR e IIS, relacionadas ao processo de desenvolvimento, diferenciação de castas e capacidade reprodutiva de *A. mellifera* e presentes também em *M. quadrifasciata*. Uma análise filogenética dos membros do *cluster* presente em *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *F. varia*, gerou um modelo coerente que mostra semelhanças entre representantes da família YELLOW, bem como com a única representante da família MRJP a *mrjp9* nas abelhas sem ferrão, denominada, *mrjp9-like*; sendo mais uma evidência da origem comum dessa família de genes. Por RT-qPCR, observamos que a expressão de *mrjp9-like* nas glândulas hipofaríngeas aumenta com a idade e que a expressão de *yellow-e3/h* também é maior em 22 dias. A análise filogenética agrupou os genes das MRJPs com os genes *yellow-e3* de ambas as espécies analisadas conforme o esperado. A morfologia das glândulas hipofaríngeas apresentou diferenças ao longo do desenvolvimento adulto, sendo estas maiores e com indicativos de maior atividade aos 22 dias de vida, caracterizado pela modificação da morfologia dos núcleos dos ácinos e evidente aumento do volume do citoplasma destas estruturas.

Palavras-chave: Abelhas nativas. *Melipona quadrifasciata*. *Major Royal Jelly Protein*. *Cluster* YELLOW. Glândulas hipofaríngeas.

ABSTRACT

Stingless bees (Meliponini) have a high level of social organization characterized by overlapping generations in the same colony, parental care and division of reproductive labor between queen and worker (castes). In stingless bees, caste differentiation is triggered by the amount of food received by the larvae. In bees of the genus *Melipona*, the allelic composition also plays a role in the castes determination and can confer genetic predisposition so that if the larva is fed with large amounts of food it develops as queen. In *Melipona*, the larval diet is rich in amino acids, lipids and proteins and is essential for the proper development of the larvae. In *Apis mellifera* bees, the proteins present in the larval food, the royal jelly, are synthesized by the hypopharyngeal glands. The genes encoding such proteins are named Major Royal Jelly Proteins (MRJP) and in *A. mellifera* these genes form a cluster composed of 9 MRJP genes flanked by genes from the YELLOW family on chromosome 11. The YELLOW genes and a MRJP gene are present in the *Melipona quadrifasciata* genome, even though they do not produce royal jelly. The high similarity between the amino acid sequence of the MRJPs and the YELLOWS of different bees suggests a common evolutionary origin in these two groups of genes (or the cluster). The main objective of this work was to analyze in females and males the expression of the *mrjp9-like*, *yellow-e3* and *yellow-h* genes in the hypopharyngeal glands of *M. quadrifasciata*, at different stages of adult life (1, 10 and 22 days of life). The sequences of the genes of interest were retrieved from the NCBI and Hymenoptera Mine databases. The orthologous genes were identified by aligning the sequences of MRJPs and YELLOW of *A. mellifera* against the genomic sequences of *M. quadrifasciata*. The characterization of these genes and their products demonstrated that the total amount of amino acids, physicochemical properties and prediction of phosphorylation sites constituted parameters capable of discriminating the components of this family. We also highlight the prediction of phosphorylation sites in the gene sequences encoding the EGFR and IIS kinases, related to the development process, caste differentiation and reproductive capacity of *A. mellifera*, both also present in *M. quadrifasciata* genome. A phylogenetic analysis of the members of the cluster present in *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* and *F. varia*, generated a coherent model that shows similarities between representatives of the YELLOW family, as well as with the only representative of the MRJP family to *mrjp9* in stingless bees, named, *mrjp9-like*; further evidence of the common origin of this family of genes. The results of RT-qPCR experiments showed that the expression of *mrjp9-like* in the hypopharyngeal glands increases with age and that the expression of *yellow-e3/h* is also higher in 22 days old bees. Phylogenetic analysis grouped the MRJP genes with the *yellow-e3* gene of both species analyzed, as expected. The morphology of the hypopharyngeal glands showed differences throughout adult development, they are larger and with indications of intense activity at 22 days of life, characterized by changes in the morphology of the acini nuclei and an evident increase in the volume of the cytoplasm of these structures.

Keywords: Stingless bees. *Melipona quadrifasciata*. Major Royal Jelly Protein. Cluster YELLOW. Hypopharyngeal glands.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vista dorsal da cabeça de uma abelha operária de *Melipona quadrifasciata*, posição na qual é realizada a dissecação das glândulas hipofaríngeas. No centro da imagem é possível ver as glândulas hipofaríngeas ocupando grande parte da capsula cefálica assim como: placa hipofaríngeal (1), ductos axiais (2) e ácidos (3). A ilustração não está em escala.....20

Figura 2 – Genes do *cluster* MRJP de *Apis mellifera* localizados no cromossomo 11 (*Chrom 11*) e *Melipona quadrifasciata* (*Scaffold 26*). *Melipona quadrifasciata* possui 5 ortólogos, sendo 4 desses da família YELLOW e um da família das MRJP (*Major Royal Jelly Protein*).....22

Figura 3 – Análise de sintenia dos genes da família YELLOW e seus ortólogos em insetos holometábolos. As quatro espécies possuem seus genomas sequenciados (esquerda para direita): *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* e *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000; Mita et al., 2004; Tribolium Genome Sequencing Consortium et al., 2008; The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) sendo possível ver que alguns genes YELLOW (barras pretas) compartilham similaridades em suas sequências e possivelmente em suas funções. As linhas tracejadas indicam sequências homólogas entre as espécies (Adaptado de Ferguson et al., 2011).....26

Figura 4 – Representação gráfica do *cluster* MRJP em *Apis mellifera* localizado no Cromossomo 11 (*Chrom 11*), *Melipona quadrifasciata* (*Scaffold 26*) e *Frieseomelitta varia* (*Scaffold 278*). Os genes destacados (vermelho) foram anotados nas 3 espécies de abelhas e pertencem ao *cluster* MRJP. Os genes destacados em *M. quadrifasciata* e *F. varia* são ortólogos.....30

Figura 5 – Filogenia dos genes MRJP e YELLOW feita por inferência bayesiana. Uma árvore foi construída a partir dos dados de alinhamento e anotação das sequências gênicas de *Apis mellifera* – AMEL (*mrjp9*, *yellow-e3*, *yellow-e*, *yellow-g* e *yellow-h*), *Frieseomelitta varia* – FVAR e *Melipona quadrifasciata* – MQUA (*mrjp9-like*, *yellow-e3*, *yellow-e*, *yellow-g* e *yellow-h*).....42

Figura 6 – Resultado da amplificação dos genes *mrjp9-like*, *yellow-h* e *yellow-e3* nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com idades não controladas visualizado em gel de agarose 1,2% corado com UniSafe Dye® - Uniscience (20.000x). A amplificação foi testada em diferentes temperaturas (60°C e 62°C), sendo 62°C a melhor temperatura de amplificação. As bandas do marcador de peso molecular estão representadas por 1: 100pb e 2: 200pb. C1, C2 e C3 (*mrjp9-like*, *yellow-h* e *yellow-e3*) representam os controles sem adição de cDNA.....**45**

Figura 7 – Expressão relativa dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. Os dias estão no eixo x assim como os valores de expressão relativa estão no eixo y e o erro padrão representado pelas barras pretas. A expressão do gene *mrjp9-like* aumenta ao longo do tempo nas amostras de operárias e machos, *yellow-e3* possui maior expressão em 22 dias para operárias e cinco dias para machos assim como *yellow-h*.....**48**

Figura 8 – Expressão relativa do gene *mrjp9-like* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. Os dias estão no eixo x assim como os valores de expressão relativa estão no eixo y e o erro padrão representado pelas barras pretas. A expressão do gene *mrjp9-like* parece ser a única que segue um padrão de expressão de acordo com a idade dos indivíduos ao contrário de *Apis mellifera* (Dobritzsch et al., 2019), podendo estar relacionado ao polietismo etário.....**49**

Figura 9 – Expressão relativa do gene *yellow-e3* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. A expressão de *yellow-e3* não parece seguir um padrão de acordo com a idade dos indivíduos, não havendo diferença entre os dias um e dez e com maior expressão em 22 dias para operárias e cinco dias para machos.....**50**

Figura 10 – Expressão relativa do gene *yellow-h* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. A expressão de *yellow-h* não segue um padrão ao longo do desenvolvimento adulto, sendo mais alta em 22 dias para operárias e cinco dias para machos.....**51**

Figura 11 – Glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com um dia de vida. Na imagem é possível ver núcleos grandes dos ácinos, agrupados e com um pequeno citoplasma, indicando pouca atividade glandular. **A:** Sem DAPI, **B:** Com DAPI, **C:** Destaque para os núcleos sem granulação, indicando pouca ou nenhuma atividade.....54

Figura 12 – Glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com dez dias de vida. Em destaque (seta vermelha) estão os núcleos das unidades secretoras, os ácinos (azul) e o ducto axial (**A:** centro, em verde). **B:** É possível perceber núcleos granulados (em atividade) e citoplasmas mais volumosos (comparados com as abelhas operárias de um dia de vida), indicando que as glândulas estão em atividade e cheias de secreção (cabeça de seta em branco).....55

Figura 13 – Glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com 22 dias de vida. Os citoplasmas são maiores quando comparados com as abelhas operárias mais jovens. **B:** Destaque para os citoplasmas cheios de secreção (cabeça de seta em branco). As setas em vermelho apontam a granulação dos núcleos, indicando atividade glandular.....56

Figura S1 – Aminoácidos presentes nas sequências das proteínas de *mrjp9-like* e *yellow-e3/h* de *Melipona quadrifasciata*. *Yellow-h* possui a maior sequência com maiores quantidades de aminoácidos específicos (Leucina e Ácido Aspártico). Os números no topo (5, 20, 30 e 50) indicam as quantidades totais das barras, assim como as linhas cinzas nas laterais.....67

Figura S2 – Quantidade total dos aminoácidos nas sequências de *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata*. Os aminoácidos específicos presentes em grandes quantidades em ambas as sequências são Valina, Serina e Leucina. Esses aminoácidos possuem papéis biológicos importantes relacionados às vias de mTOR e de hipóxia endocelular ([KEGG](#)).....68

Figura S3 – Propriedades físico-químicas de *mrjp9-like*. Sua sequência é composta majoritariamente por aminoácidos pequenos, básicos, polares e não-polares com um valor calculado de *pI* (*pi-value*) de 5.846718. O ponto isoelétrico (*pI*) representa o pH no qual a carga de uma proteína em meio líquido é 0. Quanto

mais próximo de 0 for o ponto isoelétrico (pI) mais ácida é a proteína enquanto que, quanto mais alto for o valor de pI, mais básico serão seus aminoácidos (M.J. Betts, R.B. Russell. Amino acid properties and consequences of substitutions. In **Bioinformatics for Geneticists**, M.R. Barnes, I.C. Gray eds, Wiley, 2003.).....**69**

Figura S4 – Propriedades físico-químicas de *yellow-e3*. Sua sequência é composta majoritariamente por aminoácidos pequenos, básicos, polares e não-polares com um valor calculado de pI de 6.325877.....**69**

Figura S5 – Propriedades físico-químicas de *yellow-h*. Sua sequência é a maior entre os genes analisados e é composta majoritariamente por aminoácidos pequenos, ácidos, polares e não-polares com um valor calculado de pI de 5.257129.....**70**

Figura S6 – Estrutura dos genes *yellow-e3/h* e *mrjp9-like*. Os retângulos representam os éxons e as linhas os íntrons. Os tamanhos dos fragmentos estão em pares de base (pb), abaixo das linhas está o tamanho dos íntrons e acima dos retângulos o tamanho dos éxons. As setas vermelhas “↳↯” indicam as regiões em que foram desenhados os *primers forward* “↯” e *reverse* “↳”. O símbolo “▼” indica o códon de iniciação de cada gene.....**70**

Figura S7 – Glândulas salivares de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com até dez dias de vida coradas com DAPI. As setas em vermelho indicam os núcleos (azul) das estruturas secretoras das glândulas salivares.....**71**

Figura S8 – Glândulas salivares de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com 22 dias de vida. **A:** As setas em vermelho indicam os núcleos (azul) das estruturas secretoras das glândulas salivares. **B:** As setas em branco indicam os ductos coletores das glândulas salivares e as cabeças de seta, o citoplasma.....**72**

Figura S9 – Glândulas salivares de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* de idades não determinadas. No centro da imagem é possível identificar a bolsa salivar em formato de “V” e os núcleos (pontos em azul). Nas laterais estão as glândulas salivares assim como os ductos condutores.....**73**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Descrição das amostras de RNA total das glândulas hipofaríngeas utilizadas para síntese de cDNA. No total, foram 75 amostras para este experimento.....**33**
- Tabela 2** – Sequência dos nucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse. O (*) indica a temperatura de anelamento do *primer* programada no termociclador.....**34**
- Tabela 3** – Identificação dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* em *Melipona quadrifasciata* nas bases de dados NCBI e Hymenoptera Mine.....**37**
- Tabela 4** – Características moleculares dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata* e dos genes MRJP de *Apis mellifera*. Abaixo está o número total de aminoácidos nas sequências dos genes, a predição de sítios de fosforilação realizada pelo servidor NetPhos 3.1 (Blom et al., 2004) (S: Serina, T: Treonina, Y: Tirosina), o peso molecular (Mw) dado em kilodaltons e o ponto isoelétrico (pI). Os dados de *Apis mellifera* foram retirados de (Buttstedt et al., 2014).....**39**
- Tabela 5** – Preferência de códons dos aminoácidos mais abundantes nas sequências de *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata*. As sequências estão na orientação 5'-3' como molde a fita de mRNA.....**41**
- Tabela S1** – Grupos de insetos eussociais e solitários (*) que possuem genes do *cluster* MRJP e ortólogos. A expressão das MRJPs pode ocorrer em diferentes estruturas dentro desses táxons como glândulas hipofaríngeas, glândulas de veneno e corpos cogumelares (Células Kenyon). Além disso, sua função não se restringe apenas às funções alimentares e podem ser expressos tanto em machos quanto em fêmeas (Drapeau et al., 2006).....**74**
- Tabela S2** – Grupos de insetos que possuem genes da família YELLOW. Há uma grande irradiação desses genes ao longo da evolução de Hexapoda.....**75**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A FAMÍLIA DE GENES MRJP	22
1.2. A FAMÍLIA DE GENES YELLOW	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. BIOINFORMÁTICA	29
3.1.1. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES MRJP E YELLOW	30
3.2. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
3.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	31
3.3.1. EXTRAÇÃO DE RNA.....	31
3.3.2. AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL.....	34
3.3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	35
3.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. GENES ORTÓLOGOS DO <i>CLUSTER</i> MRJP: BUSCA, ANOTAÇÃO E DESCRIÇÃO	37
4.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES MRJP E YELLOW.....	42
4.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA: PCR CONVENCIONAL.....	44
4.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA: RT-qPCR.....	46
4.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE <i>MELIPONA QUADRIFASCIATA</i>	52
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A	68
ANEXO B	75

1. INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão (Meliponini) compreendem um grande grupo de organismos eussociais devido a diferenciação de castas, sobreposição de gerações na mesma colônia, cuidado parental e divisão reprodutiva de trabalho (Michener, 1974; Wilson, 1971). A diferenciação de castas é um fenômeno precoce durante o desenvolvimento que é regulado pelo hormônio juvenil (HJ) em conjunto com ecdisteroides, possuindo forte influência também na divisão de trabalho das abelhas adultas. Esses hormônios são sintetizados, respectivamente, em um par de glândulas chamadas *corpora allata* e em glândulas protorácicas (Hartfelder, 1993; Hartfelder et al., 2006; Rachinsky et al., 1990). Além das glândulas protorácicas, os ecdisteróides também podem ser sintetizados nos ovários de abelhas adultas (Feldlaufer et al., 1986, 1985), corpo gorduroso e cérebro (Yamazaki et al., 2011). Dentro da tribo Meliponini, há dois fatores responsáveis pela diferenciação de castas, podendo ser quantitativo-alimentar ou genético-alimentar. Na maioria das espécies de abelhas sem ferrão a diferenciação é trófica, ou seja, as castas serão definidas pela quantidade de alimento oferecido à larva (Michener, 2007). Esse é um caso de polifenismo que pode ser encontrado nos insetos, sendo regulado pela alimentação diferencial (Evans & Wheeler, 1999).

Entretanto, o fator determinante das castas em abelhas do gênero *Melipona* é o genético-alimentar, nestas o fenótipo feminino está relacionado a um conjunto de fatores epigenéticos que desencadeiam uma cascata de ativação de expressão de genes responsáveis por tornar uma larva em rainha ou operária (Brito et al., 2015; Cardoso-Júnior et al., 2017). As vias metabólicas frequentemente relacionadas ao processo de diferenciação de castas são as de TOR (*Target of rapamycin*) e insulina (*IIS*). Estas estão envolvidas em processos de crescimento celular, desenvolvimento e reprodução, sendo diretamente afetadas por fatores nutricionais (Foret et al., 2012; Patel et al., 2007; Teleman, 2011; Cardoso-Júnior et al., 2017). Essas vias são altamente conservadas ao longo da evolução dos metazoários, sendo que, em Hymenoptera, estes genes podem apresentar diferentes perfis de metilação em resposta a um determinado contexto, seja social ou ambiental (Kucharski, Foret, & Maleszka, 2015).

Entre as castas, as diferenças podem estar em repertórios comportamentais, capacidade reprodutiva e características morfológicas. As rainhas possuem um sistema reprodutivo bem desenvolvido, presença de ovários com pelo menos 4 ovariolos cada, espermateca, ausência de corbícula e tamanho corporal maior do que as operárias quando fecundada (Cruz-Landim et al., 1998; Foret et al., 2012). Não obstante, as operárias são responsáveis pela execução de tarefas relacionadas a manutenção da colônia, como alimentação das larvas e da rainha, limpeza, construção de favos, coleta de recursos e defesa (Johnson, 2010).

As tarefas executadas pelas operárias são divididas de acordo com sua idade, onde um indivíduo jovem desempenha funções intranidais como alimentação das larvas e da rainha, limpeza e desidratação do néctar, enquanto que um indivíduo mais velho executa funções externas à colônia como defesa e coleta de recursos. As operárias podem ser caracterizadas pelas suas atividades como faxineiras, alimentadoras, engenheiras, guardas e forrageiras (Beshers & Fewell, 2001; Hammel et al., 2015; Johnson, 2010; Robinson, 1992). Toda essa divisão de trabalho está relacionada ao polietismo etário, quando há o desenvolvimento de glândulas importantes para a execução de tarefas intranidais, como as de cera, as hipofaríngeas e as salivares (Cavalcante et al., 2000; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Huang, 1990; Smodiš Škerl & Gregorc, 2015).

Todas essas especializações de trabalho acarretam mudanças fisiológicas que ocorrem em associação com as mudanças de comportamento das operárias. Essas mudanças fisiológicas e comportamentais podem ser reguladas com grande plasticidade de acordo com as interações sociais dos indivíduos (Pinter-Wollman et al., 2012; Shorter & Tibbetts, 2009; Ueno et al., 2009). Entretanto, as tarefas não são fixas entre as operárias e podem ser alteradas de acordo com as necessidades da colônia. Em condições adversas, se uma colônia perde grande parte de suas forrageiras, indivíduos mais jovens podem ser recrutados para substituir a função de forrageamento (Beshers & Fewell, 2001; Huang & Robinson, 1992; Robinson, 1992; Wilson, 1971).

As glândulas hipofaríngeas são estruturas morfológicamente muito diversas encontradas na ordem Hymenoptera e estão localizadas na capsula cefálica. São compostas por uma placa hipofaríngea e por ductos axiais interligados a estruturas

chamadas de ácidos, onde estão localizados os conjuntos de células secretoras (**Figura 1**) (Corby-Harris & Snyder, 2018; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Snodgrass, 1956).

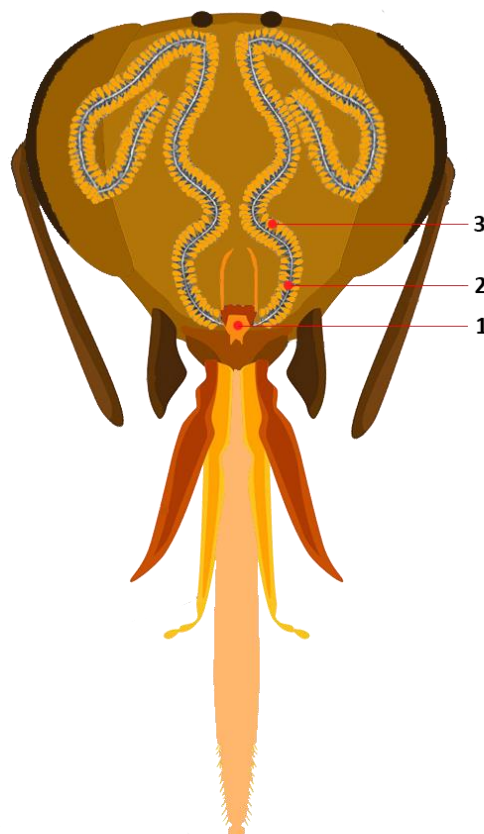


Figura 1 – Vista dorsal da cabeça de uma abelha operária de *Melipona quadrifasciata*, posição na qual é realizada a dissecção das glândulas hipofaríngeas. No centro da imagem é possível ver as glândulas hipofaríngeas ocupando grande parte da capsula cefálica assim como: placa hipofaríngea (1), ductos axiais (2) e ácidos (3). A ilustração não está em escala.

Essas glândulas são compostas por milhares de unidades de dois tipos celulares, células do ducto e secretoras. As células secretoras possuem como função depositar substâncias que compõem o alimento larval de Apini e Meliponini nos canalículos, estes levarão as substâncias até os ductos coletores e axiais e por fim, encontrando a porção terminal do ducto excretor na placa hipofaríngea (Albert et al.,

2014; Cruz-Landim & Abdalla, 2002; Michener, 2007). Contudo, pode haver diferenças no tamanho, atividade e expressão gênica dessas glândulas quando abelhas de diferentes idades e funções são comparadas. Nas abelhas alimentadoras, essas glândulas possuem maior tamanho e atividade se comparado às de forrageiras. Essas diferenças ocorrem devido ao consumo assimétrico de pólen entre os indivíduos, onde abelhas mais jovens, as alimentadoras, consomem uma quantidade de pólen maior do que as operárias mais velhas, as forrageiras (Brouwers, 1983; Corby-Harris et al., 2016; Smodiš Škerl & Gregorc, 2015).

O pólen é essencial na alimentação das abelhas alimentadoras para manutenção das atividades das glândulas hipofaríngeas e para manter a coesão de suas atividades intranidais. Os compostos presentes no pólen como fitoesteróis, aminoácidos e lipídeos são essenciais para a produção de ecdisteróides e também podem reduzir a expressão de genes relacionados a autofagia das glândulas hipofaríngeas (Corby-Harris et al., 2019). A sinalização hormonal também tem a capacidade de regular o desenvolvimento dessas glândulas, estando relacionada também com a transição de tarefas dos indivíduos ao longo do tempo, ou seja, na manutenção do polietismo etário. Além disso, alguns genes expressos no corpo gorduroso como a vitelogenina (*vg*) e *ultraspiracle* (*usp*), também regulados pelo hormônio juvenil (HJ) estão envolvidos na transição de tarefas intranidais para o forrageamento e na especialização na coleta de pólen ou néctar pelas operárias (Ament et al., 2012; Nelson et al., 2007). Tanto a vitelogenina (*vg*) quanto as MRJPs (1-9) podem ser reguladas positivamente para influenciar essas transições comportamentais a partir de fragmentos longos de RNA não codificante (LncRNA). Esses fragmentos não codificantes atuam tanto nas regiões *cis* quanto *trans* das regiões regulatórias desses genes (Liu et al., 2019).

Os genes expressos nas glândulas hipofaríngeas são responsáveis pela codificação de aminoácidos que constituem as proteínas da geleia real em *Apis mellifera* (Ohashi et al., 1997; Santos et al., 2005). No entanto, a produção dessas proteínas depende da interação entre o consumo de pólen e níveis de ecdisteróides e vitelogenina (Winkler et al., 2018). Contudo, ainda que as abelhas *Melipona quadrifasciata* não produzam geleia real, genes ortólogos foram localizados em seu genoma, em um *cluster* chamado de MRJP (*Major Royal Jelly Protein*) (**Figura 2**). Os

genes ortólogos encontrados em *Melipona quadrifasciata* são: *yellow-g*, *yellow-e*, *yellow-e3*, *mrjp9-like* e *yellow-h*, sendo que, a análise destes genes constitui um dos objetivos deste trabalho.

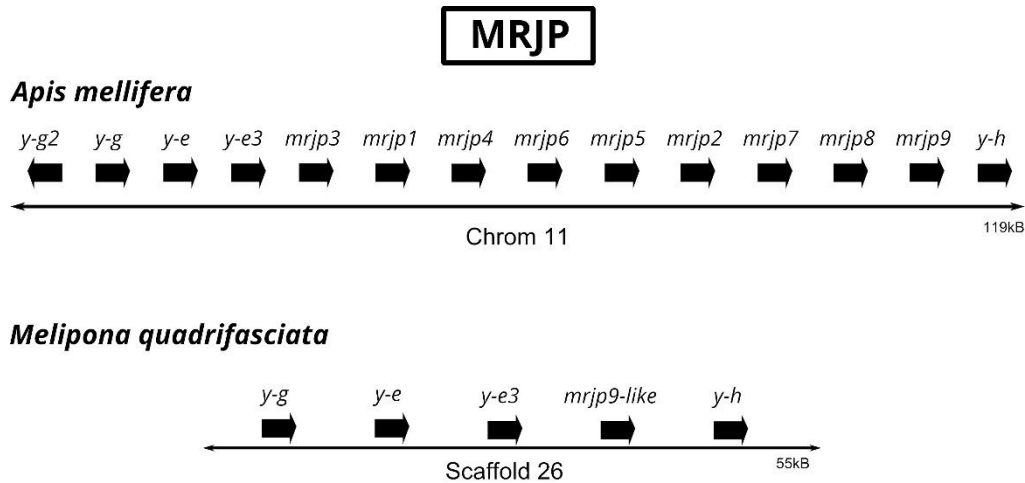


Figura 2 – Genes do *cluster* MRJP de *Apis mellifera* localizados no cromossomo 11 (*Chrom 11*) e *Melipona quadrifasciata* (*Scaffold 26*). *Melipona quadrifasciata* possui 5 ortólogos, sendo 4 desses da família YELLOW e um da família das MRJP (*Major Royal Jelly Protein*).

1.1. A FAMÍLIA DE GENES MRJP

O grupo de genes da família MRJP (*Major Royal Jelly Protein*) parece ser comum na ordem Hymenoptera, desde insetos solitários até eussociais como formigas, abelhas e vespas. Esses genes desempenham diversas funções, uma vez que podem ser expressos em estruturas relacionadas à memória e aprendizagem, como os corpos cogumelares (Células de Kenyon), cérebro, glândulas hipofaríngeas, e glândulas de veneno em *Apis mellifera* (Buttstedt et al., 2014; Kucharski et al., 1998; Peiren et al., 2005). Sua expressão parece depender do contexto, uma vez que a sua função nutricional pode implicar em diferentes fenótipos, podendo também alterar aspectos relacionados à atividade de forrageamento (Drapeau et al., 2006).

Além disso, as MRJPs parecem desempenhar um papel importante na transição de operárias alimentadoras (*nurses*) para forrageiras uma vez que os níveis de expressão de alguns genes do *cluster* podem aumentar ou diminuir ao longo dessa transição. Contudo, esse efeito parece ser reversível devido à grande plasticidade dos

indivíduos na execução de tarefas da colônia, ou seja, abelhas forrageiras podem voltar a executar tarefas de abelhas alimentadoras em contextos específicos (Kucharski et al., 1998; Ohashi et al., 1997, 2000). O grupo de genes MRJP estão localizados em um *cluster* composto por 9 genes, sendo flanqueados por 5 genes da família YELLOW em abelhas *Apis mellifera* (Buttstedt, Moritz, & Erler, 2014). As MRJPs (1-9) de *Apis mellifera* possuem funções específicas e foram nomeadas sequencialmente, conforme foram sendo descritas ao longo do tempo. As proteínas codificadas pelos genes do *cluster* possuem regiões hidrofóbicas N-terminais, sendo comum em algumas MRJPs, possibilitando diferentes níveis de glicosilação (Albert et al., 1999).

A proteína MRJP1 foi a primeira *Major Royal Jelly Protein* a ser nomeada, podendo ser expressa no cérebro e corpos cogumelares de machos, rainhas e operárias e em glândulas hipofaríngeas de operárias (Buttstedt, Moritz, & Erler, 2013). Possui atividade antibacteriana e antifúngica (Brudzynski & Sjaarda, 2015; Fujiwara et al., 1990), podendo ser regulada negativamente pela Beta-Ecdisterona (20-hidroxiecdisona), hormônio relacionado ao processo de ecdise e metamorfose dos insetos (Winkler et al., 2018). Essa regulação também pode ocorrer a partir de fatores de transcrição associados a regiões específicas das MRJPs. Na sequência da *mrjp1* há dois sítios de ligação para *ultraspiracle* (USP), gene que codifica uma proteína que compõem os receptores de ecdisona. *Usp* pode atuar como um fator de transcrição de ligação ao hormônio juvenil, atuando como um mediador na expressão de *mrjp1* em resposta ao hormônio juvenil (Ament et al., 2012; Malecová et al., 2003).

Além disso, a MRJP1 é a proteína mais abundante na geleia real, podendo polimerizar e formar um complexo com outra proteína chamada Apisimina. Essa proteína é composta por longas estruturas fibrosas que fornecem maior viscosidade à geleia real, restando a larva da rainha na superfície da célula real, evitando sua queda (Buttstedt et al., 2018). A viscosidade está relacionada a condições ácidas (pH 4.0) da geleia real devido a presença de secreções que contem ácidos graxos produzidos nas glândulas mandibulares e proteínas, produzidas nas glândulas hipofaríngeas (Bilikova et al., 2002; Hoffmann, 1960).

O gene *mrjp2* é expresso na cabeça de rainhas e machos e em glândulas hipofaríngeas de operárias, codifica uma proteína com propriedades antibacterianas

e antifúngicas, sendo a terceira proteína mais encontrada na geleia real (Bilikova, Wu, & Simuth, 2001; Buttstedt, Moritz, & Eler, 2013). Entre suas propriedades está a capacidade de inibir ou retardar o crescimento de determinadas bactérias, pois podem formar complexos capazes de aglutinar esses organismos devido ao processo glicosilação (Bilikova et al., 2009; Brudzynski & Sjaarda, 2015; Feng et al., 2015). Esse processo ocorre devido a regiões hidrofóbicas nas regiões N-terminais da proteína MRJP2 (Bilikova et al., 2009).

O gene *mrjp3* codifica uma proteína presente em ambos os sexos e castas que desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica, imunidade e metabolismo dos indivíduos. Isso por que a proteína MRJP3 é capaz de atuar como fator agregador de RNA devido a regiões repetitivas em *tandem* nos aminoácidos, formando grânulos de ribonucleoproteínas que concentram e protegem o RNA de ser degradado por RNases, aumentando sua biodisponibilidade no alimento larval (Maori et al., 2019; 2019). Essas interações possibilitam o compartilhamento de RNA entre os indivíduos, facilitando a transferência horizontal ao longo das gerações e podendo aumentar sua resposta imune contra vírus e outros patógenos (Garbian et al., 2012; Maori et al., 2019). Além disso, a *mrjp4* também possui atividade antibacteriana, sendo expressa em glândulas hipofaríngeas de operárias (Drapeau et al., 2006; Kim et al., 2019).

A MRJP5 junto com as MRJP1-3 compõem aproximadamente 90% do conteúdo proteico da geleia real, sendo expressa em ambos os sexos e castas (Albert et al., 1999; Buttstedt et al., 2013). Além disso, sua sequência também possui um sítio de ligação para *ultraspiracle (usp)*, semelhante a *mrjp1* que possui 2 sítios (Malecová et al., 2003). A *mrjp6-7* também são expressas em ambos os sexos e castas, sendo encontradas principalmente na cabeça.

As *mrjp8-9* são expressas na cabeça (machos, rainhas e operárias), glândulas de veneno e hipofaríngeas (operárias), representando a menor porção de MRJPs na geleia real em relação as outras (Buttstedt et al., 2013). Possuem um perfil de expressão semelhante entre as castas, e dentre todas as MRJPs, a *mrjp9* é a menos expressa, independente do tecido ou fase de vida (Buttstedt et al., 2013). São consideradas ancestrais devido à alta similaridade de suas sequencias com um gene precursor (*yellow-e3*) da família YELLOW. Contudo, *mrjp9* exibe um perfil de

expressão diferente de outros membros da família MRJPs (1-7) e pode ser encontrado homólogos em outras espécies (e.g., *Bombus terrestris*, *Camponotus floridanus*, *Harpegnathos saltator* e *Megachile rotundata*), podendo exibir diferentes funções (Buttstedt et al., 2013).

Além disso, a alta similaridade dos aminoácidos das MRJPs e das proteínas YELLOW sugere uma origem evolutiva em comum entre esses dois grupos de genes (Albert et al., 1996; Kucharski et al., 1998). A partir dessa similaridade é possível sugerir também o possível papel regulador das MRJPs em relação ao comportamento e desenvolvimento, não estando restrita apenas para funções nutricionais dessas abelhas (Albert et al., 1999; Hojo et al., 2010). Já em *Melipona quadrifasciata*, esse *cluster* é formado por um gene ortólogo (*mrjp9-like*) e flanqueado por 4 genes YELLOW. As estruturas das regiões codificadoras são altamente conservadas, sendo muito semelhantes entre si e indicando que as MRJPs teriam evoluído a partir de múltiplas e rápidas duplicações de um gene precursor chamado *yellow-e3* (Albert et al. 1999; Buttstedt, Moritz, & Erler, 2013; Drapeau et al., 2006).

1.2. A FAMÍLIA DE GENES YELLOW

Os genes da família YELLOW são encontrados em diversos organismos, desde insetos, bactérias e fungos (Drapeau et al., 2006). A primeira descrição dos genes YELLOW foi feita para *Drosophila melanogaster*, onde foi possível identificar sua expressão a partir de um fenótipo “amarelado” da cutícula e peças bucais de larvas de terceiro instar, sugerindo sua função relacionada a melanização (Biessman, 1985; Brehme, 1941). Análises filogenéticas de suas proteínas indicam que formam um grupo monofilético, distante da família das MRJPs (Albert & Kludiny, 2004). Contudo, proteínas semelhantes podem ser encontradas em outros invertebrados, isto por que o *cluster* da família YELLOW permaneceu altamente conservado ao longo da diversificação dos insetos (**Figura 3**), indicando que eventos consecutivos de duplicação gênica levaram a grande divergência na família YELLOW (Ferguson et al., 2011).

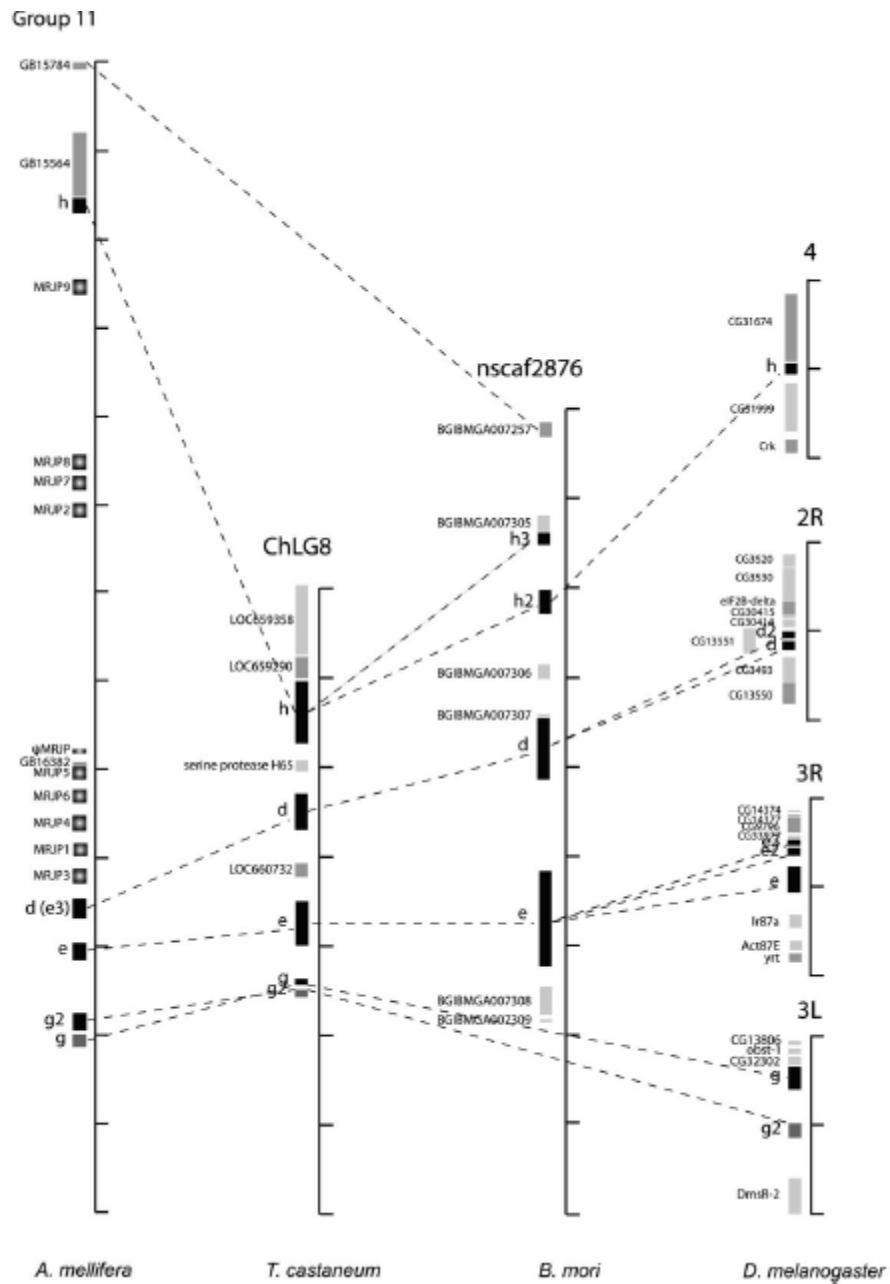


Figura 3 – Análise de sintenia dos genes da família YELLOW e seus ortólogos em insetos holometábolos. As quatro espécies possuem seus genomas sequenciados (esquerda para direita): *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* e *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000; Mita et al., 2004; Tribolium Genome Sequencing Consortium et al., 2008; The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) sendo possível ver que alguns genes YELLOW (barras pretas) compartilham similaridades em suas seqüências e possivelmente em suas funções. As linhas tracejadas indicam seqüências homólogas entre as espécies (Adaptado de Ferguson et al., 2011).

Devido a sua alta taxa de divergência, podem assumir múltiplas funções relacionadas ao desenvolvimento de padrões alares em *Heliconius* sp., pigmentação e comportamento reprodutivo de *Drosophila* sp. (Buttstedt et al., 2014; Drapeau, 2003; Drapeau et al., 2006; Wittkopp & Beldade, 2009). A função dos genes da família YELLOW ainda está sendo descrita com base em suas proteínas, entretanto, acredita-se que em alguns grupos de invertebrados como *Tribolium* sp. e *Bombyx* sp. estejam relacionadas a funções fisiológicas devido a seus padrões de expressão semelhantes com *Apis mellifera* referente ao gene *yellow-x*, encontrado nesses três grupos (Ferguson et al., 2011). Além disso, os genes YELLOW de *Apis* sp. parecem também estar relacionados ao desenvolvimento, uma vez que é possível encontrar o *yellow-f* sendo expresso em estágios embrionários (Hojo et al., 2010).

O *yellow-g* pode ser encontrado expresso tanto nos ovários de *D. melanogaster*, relacionado a funções na ovogênese, quanto em estágios embrionários de larvas de operárias de *A. mellifera* (Cardoen et al., 2011; Claycomb et al., 2004). Os genes *yellow-e*, *yellow-e3* e *yellow-h* são encontrados na cabeça de operárias de *A. mellifera*, sendo que, *yellow-e3* e *yellow-h* parecem estar relacionados a funções nutricionais uma vez que são encontrados nas glândulas hipofaríngeas (Drapeau et al., 2006).

Os genes YELLOW de *A. mellifera* se expressam em diferentes estágios de desenvolvimento, desde a larva até o adulto. Além de que, alguns desses genes podem estar expressos em algumas estruturas como glândulas, cérebro e ovários. Por não ser encontrado em um único local e fase de desenvolvimento dos indivíduos, é sugerido que as proteínas expressas são multifuncionais e dependentes do contexto e estrutura com que interagem (Drapeau et al., 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- I. Caracterizar, a partir de uma análise *in silico*, a expressão dos genes da família MRJP e YELLOW nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* e verificar se estes estão potencialmente relacionados ao polietismo etário.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Descrever os genes codificadores da família das MRJPs e YELLOW e suas proteínas em *Melipona quadrifasciata*.
- II. Avaliar o perfil de expressão dos genes da família MRJP e YELLOW nas glândulas hipofaríngeas de operárias (alimentadora e forrageira) e machos em diferentes idades de desenvolvimento.
- III. Analisar morfologicamente as estruturas das glândulas hipofaríngeas através de microscopia de fluorescência durante o desenvolvimento adulto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. BIOINFORMÁTICA

As sequências proteicas codificadas a partir dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Apis mellifera* foram recuperadas por buscas nos bancos de dados NCBI e Hymenoptera Mine. As sequências FASTA de *Apis mellifera* serviram de entrada (*input*) para alinhamentos BLASTp contra a base de dados de *Melipona quadrifasciata* para identificação dos genes ortólogos na espécie. Os ortólogos encontrados foram manualmente anotados através da ferramenta Artemis 17.0.1 (Carver et al., 2012), essa anotação serviu como base para o desenho dos *primers* na ferramenta Primer3 versão 4.1.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) e também para uma análise descritiva da composição dos aminoácidos ao longo das sequências.

A descrição dos aminoácidos nas sequências de *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* foi realizada no programa estatístico R (R Core Team 2019), utilizando os pacotes Tidyverse (Wickham et al., 2019), seqinR (Jordan & Mariño-Ramirez, 2007) e ggplot2 (Wickham, 2016). Inicialmente, as sequências em formato FASTA foram convertidas para aminoácidos utilizando a configuração de tradução em trincas a partir da metionina. Em seguida, foram retornadas as propriedades físico-químicas dos aminoácidos ao longo da sequência, assim como suas quantidades totais separadamente. Além disso, a descrição do peso molecular (Mw) das sequências foi realizada a partir do programa ProtParam (Gasteiger et al 2005) na plataforma ExPASy ([SIB](#)) assim como a predição dos sítios de fosforilação, realizada no servidor NetPhos 3.1 (Blom et al. 1999) utilizando como referência um banco de dados de proteínas de organismos eucarióticos.

3.1.1. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES MRJP E YELLOW

Os dados das análises foram coletados a partir das sequências anotadas (éxons) dos genes *yellow-g*, *yellow-e*, *yellow-e3*, *yellow-h* de *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata* e *Frieseomelitta varia*, *mrjp9* de *A. mellifera* e *mrjp9-like* de *M. quadrifasciata* e *F. varia* (**Figura 3**). As sequências foram alinhadas usando o ClustalW no software MEGA 10.0 (Kumar et al., 2018). A análise bayesiana foi executada no MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) na plataforma CIPRES (Miller et al., 2011) com duas rodadas de 4 cadeias cada em 10 milhões de gerações com o modelo GTR (*General Time Reversible*) e distribuição *gamma*. O restante dos parâmetros foi deixado como padrão. A convergência de todas as rodadas da análise bayesiana foi analisada no Tracer 1.7.1 (Rambaut et al. 2014) e a árvore filogenética foi construída usando o FigTree 1.4.4 ([FigTree v1.4.4](#)).

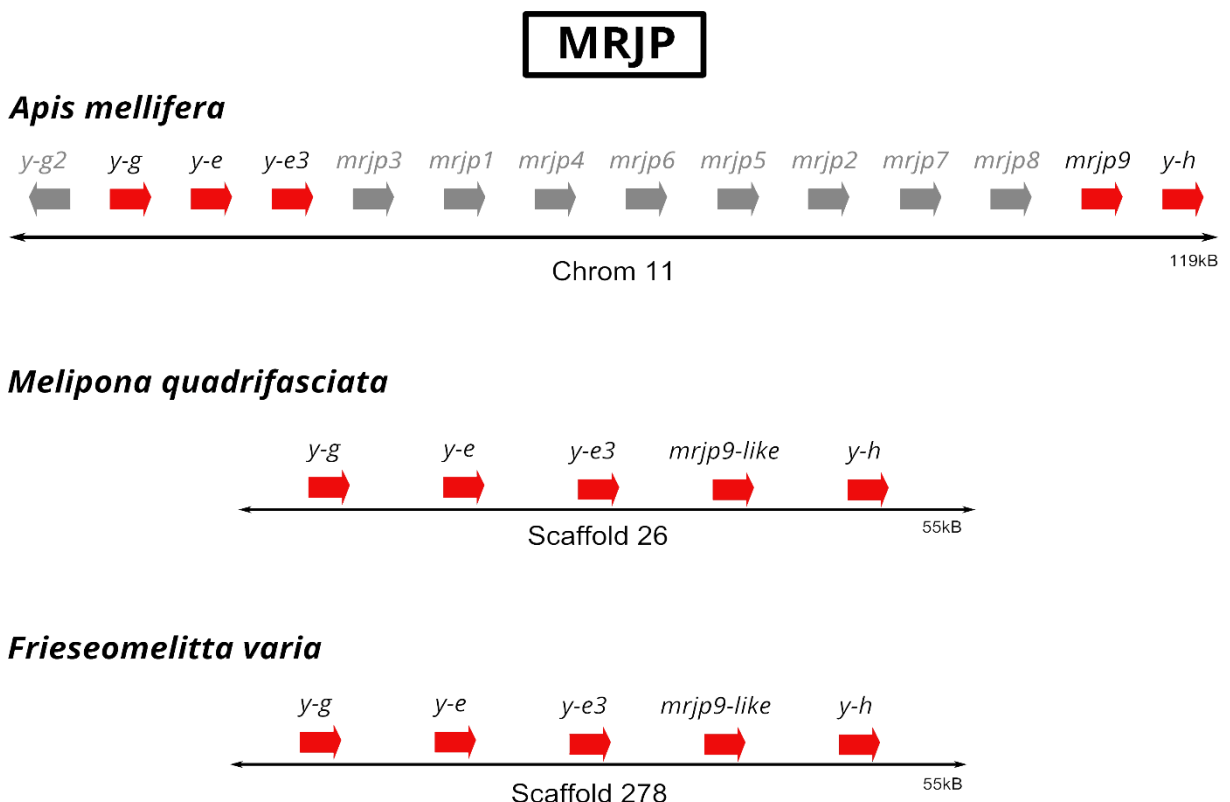


Figura 4 – Representação gráfica do *cluster* MRJP em *Apis mellifera* localizado no Cromossomo 11 (*Chrom 11*), *Melipona quadrifasciata* (*Scaffold 26*) e *Frieseomelitta varia* (*Scaffold 278*). Os genes destacados (vermelho) foram anotados nas 3 espécies de abelhas e pertencem ao *cluster* MRJP. Os genes destacados em *M. quadrifasciata* e *F. varia* são ortólogos.

3.2. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

As colônias de *Melipona quadrifasciata* foram estabelecidas em caixas de observação com temperatura controlada a 28°C no meliponário experimental no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo, Brasil. Os favos pré-emergentes foram coletados das colônias, acomodados em placas de Pétri fechadas e inseridos em estufas com umidade e temperatura controlada (28°C) até a emergência dos indivíduos.

Após a emergência, os indivíduos foram marcados no tórax com canetas Uni POSCA tinta atóxica (1,8-2,5 mm) e realocados em suas colônias de origem para posterior coleta. As operárias foram coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento (alimentadoras e forrageiras) ao longo de 1, 10 e 22 dias de vida e os machos ao longo de 1 e 5 dias de vida. A dissecação das glândulas hipofaríngeas foi realizada em solução salina 0,9% com o auxílio de um estereomicroscópio Leica M125 e de pinças esterilizadas, e posteriormente, inseridas em tubos com 300 µL de TRIzol® (Invitrogen) e armazenadas a - 80°C até a extração do RNA total. Foram feitas um total de 5 réplicas para as operárias, sendo que, cada réplica foi composta por 15 glândulas: 5 na idade de 1 dia, 10 dias e 22 dias separadamente (**Tabela 1**). Enquanto para os machos, a coleta foi composta por 2 réplicas, cada uma sendo composta por 5 glândulas nos dias 1 e 5 separadamente.

3.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

3.3.1. EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras das glândulas hipofaríngeas foram descongeladas em temperatura ambiente e a seguir, maceradas com o auxílio de pistilos plásticos estéreis. Os tubos com as amostras foram incubados à temperatura ambiente por 5 minutos para quebra das membranas e desagregação de complexos nucleoproteicos. Logo após, foram adicionados 100 µL de clorofórmio (1/5 de TRIzol®). Os tubos foram agitados manualmente por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e posteriormente, centrifugados a 12.000xg a 4°C por 15 minutos. Os

sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 mL e acrescentados 250 µL de isopropanol (Merck) (1/2 de TRIzol ®) e 1 µL de glicogênio (20mg/mL, *Molecular Biology Grade Glycogen*, Sigma-Aldrich).

As amostras foram levadas ao vórtex por 10 segundos e após, armazenadas em um freezer a - 20 °C durante 48 horas para precipitação do RNA. Após esse período, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000xg, a 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os produtos precipitados (*pellets*), lavados com 500 µL de etanol 75% (Merck). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg, a 4°C por 10 minutos. Novamente, os sobrenadantes foram descartados e o etanol remanescente foi evaporado à temperatura ambiente. Os *pellets* foram homogeneizados com 10 µL de água DEPC ultra-pura (*UltraPure™ Dnase/Rnase-Free Distilled Water*, Invitrogen), um forte inibidor da atividade de RNases. A pureza (estimada através da razão entre os valores de leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorvância óptica a 260 nm em um espectrofotômetro (*NanoDrop™ 1000*, Thermo Fisher). Após isso, as amostras foram estocadas a - 80°C até a preparação do cDNA.

3.3.2. SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído de 75 amostras de glândulas hipofaríngeas. Dentre essas 75 amostras das glândulas, 5 foram em condição de 1, 10 e 22 dias de vida, totalizando 15 amostras em cada experimento (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Descrição das amostras de RNA total das glândulas hipofaríngeas utilizadas para síntese de cDNA. No total, foram 75 amostras para este experimento.

Experimento	Dias			
	1	10	22	Total
1	5	5	5	15
2	5	5	5	15
3	5	5	5	15
4	5	5	5	15
5	5	5	5	15
Total	25	25	25	75

Os volumes de RNA total das glândulas hipofaríngeas com massa de 2 µg foram completados com 8 µL de água DEPC ultra-pura (*UltraPure™ Dnase/Rnase-Free Distilled Water*, Invitrogen). Para evitar contaminação por resíduos de DNA, foi adicionado 1 µL 10x *Dnase I Reaction Buffer* (Invitrogen), 0,5 µL de DNase I (1 U/µL, Invitrogen) e 0,5 µL de água DEPC ultra-pura 0,1% e após isso, as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM, Invitrogen) e posteriormente, incubado em termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems ®) a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima DNase I.

O RNA total tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA com volume final de 20 µL, utilizando-se, por amostra: Passo 1: 1 µL de oligo (dT)12-18 (500 ng/mL, Invitrogen) + 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM, Invitrogen), com incubação em termociclador a 65°C por 5 minutos. Passo 2: adição de 4 µL de tampão 5x *First Strand Buffer* (Invitrogen) + 2 µL de ditriotretitol (DDT – 0,1 M, Invitrogen) + 1 µL de inibidor de RNase (*RNase OUT™*, 40 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 minutos. Passo 3: adicionar 0,5 µL de água DEPC ultra-pura 0,1% + 0,5 µL da enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 U/ µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos e posteriormente, inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. As reações dos controles foram preparadas sem adição da enzima *SuperScript™ II Reverse*

Transcriptase. O cDNA das glândulas hipofaríngeas foi diluído em 10x para ser utilizado em reações de PCR convencional e RT-PCR.

3.3.2. AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL

A validação dos *primers* para os genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* foi feita através de PCR convencional. As amplificações foram realizadas a partir de 0,5 µL de *primer forward* e *reverse* na concentração de 10 µM, 1,0 µL de cDNA diluído 10x, 8,0 µL de água DEPC e 10,0 µL de PCR-MasterMix 2x (Promega). As amplificações foram realizadas com o termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems ®) com gradiente programado: 94 °C por 1 minuto (desnaturação), logo após, 40 ciclos à 94°C (desnaturação), *°C (anelamento) (**Tabela 2**) e 72°C por 35 segundos cada, 72°C por 5 minutos (extensão) e finalizando a 4°C para conservar as amostras até a retirada. Os produtos das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1,2% utilizando tampão TBE (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0), corados com SYBR ® Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000x – Invitrogen) e com aplicação de um marcador de peso molecular de 100 pb (*100 bp DNA Ladder*, 0,5 µg/µL, Invitrogen). O produto dos géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados pelo aparelho e software Kodak EDAS 290.

Tabela 2 – Sequência dos nucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de interesse. O (*) indica a temperatura de anelamento do *primer* programada no termociclador.

GENE	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	TAMANHO AMPLICON (pb)	* (°C)
<i>mrjp9-like</i>	F – 5' CGATGACTGGGGCACTTTTC 3'	177	62
	R – 5' TTGTAAGTGTCCGTTGCTGC 3'		
<i>yellow-e3</i>	F – 5' CCCCTCATCACGCCATATCC 3'	110	
	R – 5' CGGTGGGCATACTTGTGTCT 3'		
<i>yellow-h</i>	F – 5' CGACCAGGTGAAGGAAGACT 3'	203	
	R – 5' AACGCTATGCCGAAAATCCC 3'		

3.3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Primeiramente, a eficiência dos *primers* foi validada por meio de RT-qPCR. As reações foram feitas a partir de cinco diluições seriadas (1:5 – 1:25 – 1:125 – 1:625 – 1:3.125) de cDNA. A partir dos valores de *Ct* (*threshold cycle*), foram construídas curvas de regressão linear para os *primers*. O valor de *Slope* é um parâmetro utilizado para avaliar a eficiência da reação (E) a partir da fórmula: $E=10^{(-1/Slope)} - 1$. Uma reação com eficiência próxima a 100% corresponde a um valor de *Slope* -3.32. Contudo, uma boa reação deve ter uma eficiência entre 90% e 110%, correspondendo a valores de *Slope* entre -3.58 e -3.10 (Real-time PCR Handbook Thermo Fischer).

A análise de expressão dos genes (*mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h*) foi testada nas glândulas hipofaríngeas de operárias (alimentadoras e forrageiras) ao longo de um, dez e 22 dias. Para isso, o gene codificador *ribossomal protein L32* (RpL32) cuja expressão é constitutiva ao longo do desenvolvimento das abelhas (Freitas et al., 2019), foi utilizado como normalizador das reações de RT-qPCR dos genes de *Melipona quadrifasciata*. O protocolo utilizado para amplificação por RT-qPCR foi do reagente 2x qPCRBIO SyGreen Mix Separate-ROX (PCRBiosystems). A reação final para *mrjp9-like* consistiu em um volume de 15 μ L, contendo: 7,5 μ L SyGreen Mix + ROX, 0,4 μ L de *primer forward* e *reverse* (10 pmol/ μ L), 5,2 μ L de água e 1,5 de cDNA (10ng/ μ L). Enquanto que, a reação final para *yellow-e3/h* consistiu em um volume de 15 μ L contendo: 7,5 μ L SyGreen Mix + ROX, 0,2 μ L de *primer forward* e *reverse* (10 pmol/ μ L), 5,6 μ L de água e 1,5 de cDNA (10ng/ μ L). As diferentes quantidades de *primers* entre os genes foi escolhida a partir dos valores de eficiência distintos obtidos de cada um. Todas as reações foram montadas em triplicatas técnicas e processadas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher). Os pares de *primers* com eficiência ótima à 62°C foram utilizadas as respectivas condições de ciclagem: 95°C por 2 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 62°C por 25 segundos. A análise estatística da expressão relativa dos genes será de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As amostras utilizadas foram coletadas de abelhas adultas no intervalo de um, dez e 22 dias para serem fotodocumentadas. As glândulas hipofaríngeas dessas abelhas foram dissecadas em Tampão Fosfato de Sódio 1x (PBS) em gelo e em seguida fixadas em 200 µL de Paraformaldeído 4% (PFA) por quatro horas sob agitação a 2°C. Após a fixação, foi retirado o Paraformaldeído 4% (PFA) e as estruturas foram lavadas uma vez com 500 µL de solução Tampão Fosfato de Sódio + *Triton X-100* 0,1% (PBT) e duas vezes com 500 µL de solução Tampão Fosfato de Sódio 1x (PBS). O PBS é retirado para adicionar 100 µL de DAPI (1:4000/2000) e Faloidina (1:300) (50 µL de cada) e após, aguardar 40 minutos sob agitação.

Decorrido os 40 minutos, o DAPI e a Faloidina foram retirados para efetuar três lavagens com PBS 1x. Após a lavagem, as estruturas foram alocadas em lâminas histológicas com uma gota de *SlowFade* Gold Antifade Mountant™ (Thermo Fisher) para preservar os marcadores fluorescentes por mais tempo. Nas bordas da lamínula foi adicionado um pouco de glicerol para selar e adquirir melhor aderência à lâmina. As fotos foram feitas em um microscópio ZEISS Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) com os filtros para DAPI e Faloidina separadamente. Os filtros foram utilizados de acordo com as configurações do microscópio ZEISS Axio Imager 2, para DAPI: 49 DAPI com comprimento de onda de 358nm à 461nm e Faloidina: 65 HE AF 488 com comprimento de onda de 496nm à 516nm. A cor dos filtros foi definida como padrão para a Faloidina (verde) e para o DAPI (Azul). O software Axioscan foi usado para a sobreposição dos filtros para DAPI e 65 HE AF 488.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. GENES ORTÓLOGOS DO CLUSTER MRJP: BUSCA, ANOTAÇÃO E DESCRIÇÃO

O *cluster* das MRJPs é altamente conservado em alguns grupos dentro de Hymenoptera, sendo encontrado em organismos solitários (*i.e* *Nasonia vitripennis*, *Megachile rotundata*) e com diferentes níveis de socialidade (*i.e* *Bombus* sp., *Atta cephalotes*, *Cerapachys biroi*, *Camponotus floridanus*, *Linepithema humile*) cujos genomas encontram-se disponíveis (**Anexo B – Tabela S1**). Os genes YELLOW também são altamente conservados ao longo da evolução dos insetos e a partir da análise de suas sequências é possível identifica-los em diversos grupos dentro de Hexapoda cujos genomas também se encontram disponíveis (**Anexo B – Tabela S2**). Uma busca no genoma de *Melipona quadrifasciata* retornou cinco genes ortólogos e destes cinco, três foram anotados (**Tabela 3**) com destaque para seus éxons, íntrons e tamanho em pares de bases (**Anexo A – Figura S6**). Além disso, cinco ortólogos também foram encontrados em *Frieseomelitta varia*, com sequências similares tanto aos genes de *Apis mellifera* quanto de *Melipona quadrifasciata*. Dentre esses cinco ortólogos, quatro são genes da família YELLOW (*-g*, *-e*, *-e3* e *-h*) e um das MRJPs (*mrjp9-like*). Foram executados alinhamentos BLASTp contra a base de dados GenBank/NCBI e *BeeBase* (Hymenoptera Mine) dos genes anotados de *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata*. As sequências de *Frieseomelitta varia* foram recuperadas e alinhadas a partir do servidor do Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas (LBDA).

Tabela 3 – Identificação dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* em *Melipona quadrifasciata* nas bases de dados NCBI e Hymenoptera Mine.

GENE	NCBI	HYMENOPTERA MINE
<i>mrjp9-like</i>	AIU92945.1	MQUA14563
<i>yellow-e3</i>	KOX78395.1	MQUA14563
<i>yellow-h</i>	KOX78394.1	MQUA18015-RA

Além disso, o alinhamento e anotação dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* em *Melipona quadrifasciata* permitiu descrever a composição dos aminoácidos em suas sequências (**Anexo A – Figura S1 e Figura S2**) e suas propriedades físico-químicas (**Anexo A – Figura S3, Figura S4 e Figura S5**). Este tipo de descrição serve como auxílio para elucidar a estrutura dessas proteínas assim como, possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição (Malecová et al., 2003), sítios de fosforilação e glicosilação (Buttstedt et al., 2014) ou outros compostos como RNA (Liu et al., 2019) e proteínas associadas (Bilikova et al., 2002). Todas essas descrições estão detalhadas em *Apis mellifera* e pouco se sabe sobre a relação dos genes do *cluster* das MRJPs de Meliponini com outros compostos e como estes interagem com o desenvolvimento, diferenciação de castas, reprodução e imunidade desses organismos. A descrição detalhada das sequências é um dos caminhos que nos permite descrever possíveis papéis que essas proteínas podem desempenhar onde são encontradas e com as estruturas com as quais interagem.

As três proteínas codificadas por esses genes (*mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h*) também podem estar relacionadas com atividade antibacteriana uma vez que os aminoácidos relacionados a essas atividades são encontrados em quantidades expressivas em suas sequências, como a Prolina (Pro – P) e Glicina (Gly – G) (**Anexo A – Figura S1 e Figura S2**) (Bulet et al., 1999). A Cisteína (Cys – C) foi encontrada em baixas quantidades nessas sequências proteicas, também relacionada com atividade antibacteriana em insetos (**Anexo A – Figura S1 e Figura S2**).

Proteínas ou peptídeos ricos em Prolina (Pro – P), como as proteínas descritas acima, podem estar relacionadas com a glicosilação devido a afinidade que esses compostos possuem com os sítios de ligação glicosídica das moléculas de açúcares (Bulet et al., 1999). Alguns peptídeos ricos em Cisteína (Cys – C) fazem parte de uma classe de compostos chamados defensinas, estes compostos estão presentes no sistema imune dos insetos, atuando como agentes antibacterianos, podendo ser encontrados em diversos grupos dentro de Pterygota (Bulet et al., 1999; Z. Li et al., 2017). Entretanto, são necessárias análises mais detalhadas para afirmar se a quantidade desses aminoácidos está dentro dos limites que explicam sua função biológica nos diferentes organismos, assim como sua biodisponibilidade e interação com outros compostos.

Algumas das características moleculares das sequências dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata* foram descritas a partir da quantidade total de aminoácidos presentes nas sequências, assim como, a predição de sítios de fosforilação, peso molecular (kDa) e o ponto isoelétrico (pI). A fosforilação é um processo importante relacionado aos mecanismos de regulação das proteínas, podendo exercer diversos efeitos pós-translacionais relacionados à regulação da expressão gênica (Blom et al., 2004).

As quinases são as principais enzimas que catalisam o processo de fosforilação, sendo que, algumas possuem maior afinidade por substratos proteicos que contenham aminoácidos específicos, como por exemplo, a Serina (Ser – S), Treonina (Thr – T) ou Tirosina (Tyr – Y) (Blom et al., 2004). A predição dos sítios de fosforilação das sequências dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* realizada no servidor NetPhos 3.1 listou as seguintes quinases relacionadas: ATM, DNAPK, PKA, PKC, CK1, CK2, CDK5, PKB, p38MAPK, PKA, PKG, RSK, SRC (FRK em invertebrados), GSK3, EGFR e INSR (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Características moleculares dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata* e dos genes MRJP de *Apis mellifera*. Abaixo está o número total de aminoácidos nas sequências dos genes, a predição de sítios de fosforilação realizada pelo servidor NetPhos 3.1 (Blom et al., 2004) (S: Serina, T: Treonina, Y: Tirosina), o peso molecular (Mw) dado em kilodaltons e o ponto isoelétrico (pI). Os dados de *Apis mellifera* foram retirados de (Buttstedt et al., 2014).

<i>Melipona quadrifasciata</i>				
GENE	AMINOÁCIDOS	PREDIÇÃO DE SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO	Mw (kDa)	pI
<i>mrjp9-like</i>	389	S: 20 T: 20 Y: 07	43.66	5.84
<i>yellow-e3</i>	423	S: 40 T: 18 Y: 06	47.91	6.32
<i>yellow-h</i>	542	S: 53 T: 21 Y: 17	61.77	5.25
<i>Apis mellifera</i>				
<i>mrjp1</i>	413	S: 13 T: 02 Y: 09	46.86	5.03
<i>mrjp2</i>	435	S: 05 T: 04 Y: 06	49.15	6.65
<i>mrjp3</i>	524	S: 09 T: 02 Y: 09	59.49	6.50
<i>mrjp4</i>	444	S: 14 T: 04 Y: 08	50.67	5.74
<i>mrjp5</i>	578	S: 16 T: 08 Y: 11	68.13	5.95
<i>mrjp6</i>	417	S: 09 T: 02 Y: 10	47.58	6.01
<i>mrjp7</i>	426	S: 11 T: 09 Y: 09	48.66	4.85
<i>mrjp8</i>	400	S: 04 T: 02 Y: 05	45.06	5.81
<i>mrjp9</i>	403	S: 06 T: 02 Y: 09	46.27	8.62

Algumas das quinases relacionadas a vias como: EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e INSR (*Insulin Receptor*) desempenham papéis importantes na alimentação, desenvolvimento e diferenciação de castas das abelhas eussociais. A EGFR por exemplo, quando associada a uma proteína chamada Royalactina (derivada da MRJP1) de *Apis mellifera*, parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento das castas dessas abelhas, afetando perfis de metilação e os títulos de hormônio juvenil (Kamakura, 2012). Contudo, outros estudos sugerem análises mais específicas em relação à EGFR, sendo necessário investigações mais profundas para entender de fato qual é a relação da EGFR com a proteína Royalactina e a diferenciação de castas em *Apis mellifera* (Maleszka, 2018).

Já a via de insulina (IIS), assim como seus receptores (INSR), são conhecidos por estarem relacionados ao metabolismo de carboidratos, participando ativamente da regulação das relações entre os insetos eussociais, com diferentes níveis de expressão entre operárias alimentadoras, forrageiras, rainhas e machos (Chandra et al., 2018; Ihle et al., 2019; Smith et al., 2008; Woodard et al., 2011). Essas diferenças são essenciais na divisão de trabalho, um dos pilares da eussocialidade, sendo que, pouco se sabe sobre o funcionamento desses mecanismos nas abelhas sem ferrão. Estudos futuros são necessários para esclarecer e elucidar como essas vias metabólicas, quinases e proteínas (MRJP e YELLOW) interagem com a fisiologia, genética e a biologia de Meliponini.

Além disso, a descrição das sequências dos aminoácidos envolvendo aspectos bioquímicos e moleculares pode trazer à luz, modelos envolvendo a ação de diferentes níveis de seleção para determinados tipos de fenótipos que não necessariamente alterem a aptidão dos indivíduos. Um desses modelos é a Teoria Molecular da Evolução Neutra, onde é possível estimar taxas de substituição dos nucleotídeos em determinadas populações de organismos (Kimura, 1980; Li, 1987). Essas mutações conseqüentemente podem alterar a sequência do códon de determinados aminoácidos, não necessariamente alterando seu caráter funcional (Kimura, 1980). As sequências dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata* possuem grandes quantidades de aminoácidos com as trincas dos códons altamente variáveis (**Tabela 5**), como é o caso da Leucina (Leu – L), Serina (Ser – S) e Valina (Val – V) (**Anexo A – Figura S1 e Figura S2**).

Tabela 5 – Preferência de códons dos aminoácidos mais abundantes nas sequências de *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata*. As sequências estão na orientação 5'-3' como molde a fita de mRNA.

AMINOÁCIDO	CÓDON
Leucina (L)	UUA
	UUC
	CUU
	CUC
	CUA
	CUG
Serina (S)	UCU
	UCC
	UCA
	UCG
	AGU
	AGC
Valina (S)	GTT
	GTC
	GTA
	GTG

Pesquisas futuras são necessárias para avaliar as taxas de mutações e de substituições dos nucleotídeos nas regiões que contemplem o *cluster* MRJP entre diferentes espécies que possuam tanto MRJPs quanto YELLOWS. Essas análises apenas fazem sentido a nível populacional, em uma longa escala de tempo, podendo ser intraespecífica ou interespecífica (Kapheim et al., 2015). Contudo, o assunto é trazido com o objetivo de promover *insights* e ampliar as perspectivas sobre como o *cluster* das MRJPs pode ter evoluído ao longo do tempo, tanto em Meliponini quanto em Apini e que tipo de seleção pode estar atuando para manter a conservação desse *cluster* em diversos grupos de Hymenoptera tanto solitários quanto eussociais, assim como, ajudar na compreensão de como ocorreram os eventos de duplicação gênica a partir do gene ancestral *yellow-e3* (Drapeau et al., 2006) nos grupos que apresentam as MRJPs.

4.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES MRJP E YELLOW

A filogenia dos genes MRJP/YELLOW de *Apis mellifera*, *Frieseomelitta varia* e *Melipona quadrifasciata* indica pelo menos 4 agrupamentos, sendo que, os genes *yellow-e*, *yellow-h* e *yellow-g* de ambas as espécies compartilham maior similaridade entre si, diferente do *yellow-e3*. O *yellow-e3* forma um grupo com a *mrjp9/mrjp9-like* de ambas as espécies pois compartilham maior similaridade entre si do que com os outros genes YELLOW (**Figura 5**).

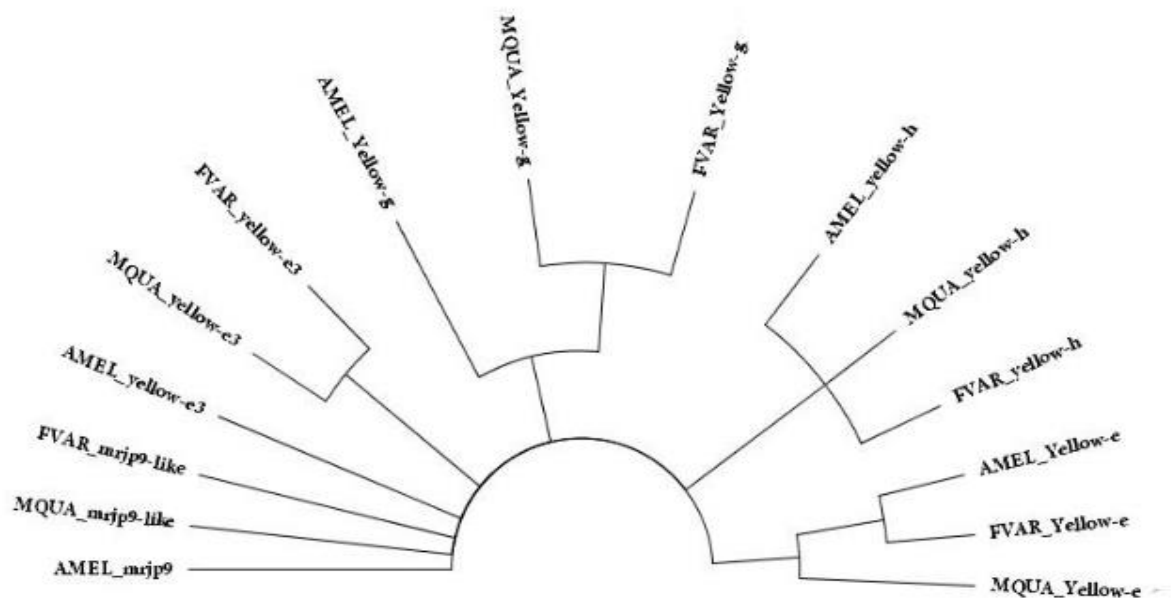


Figura 5 – Filogenia dos genes MRJP e YELLOW feita por inferência bayesiana. Uma árvore foi construída a partir dos dados de alinhamento e anotação das sequências gênicas de *Apis mellifera* – AMEL (*mrjp9*, *yellow-e3*, *yellow-e*, *yellow-g* e *yellow-h*), *Frieseomelitta varia* – FVAR e *Melipona quadrifasciata* – MQUA (*mrjp9-like*, *yellow-e3*, *yellow-e*, *yellow-g* e *yellow-h*).

Em *Apis mellifera* análises de similaridade das sequências mostram que a *yellow-e3* deu origem as outras MRJPs por eventos consecutivos de duplicação gênica (Drapeau et al., 2006). Sabendo que o gênero *Apis* expandiu sua diversificação há pelo menos 22 milhões de anos atrás (Cardinal & Danforth, 2013, 2011), é possível

perceber uma grande diversidade dos genes MRJPs devido a esses eventos de duplicação. Contudo, no gênero *Melipona* (Subgênero *Melipona*), que tem sua divergência estimada entre 17 e 25 milhões de anos atrás (Rasmussen & Cameron, 2010), há apenas uma MRJP (*mrjp9-like*), assim como *Frieseomelitta varia* (*mrjp9-like*), com divergência estimada entre 26 milhões de anos atrás (Rasmussen & Cameron, 2010), sendo possível identificar que não houve eventos sucessivos de duplicação gênica das MRJPs como houve em abelhas do gênero *Apis*.

A expansão do *cluster* MRJP parece ter sido acompanhada pela diversificação de funções que as proteínas MRJPs desempenham no desenvolvimento de *Apis mellifera*, incluindo um papel fundamental na diferenciação de castas (Dobritsch et al., 2019; Drapeau et al., 2006). Em abelhas sem ferrão, essa expansão parece estar limitada apenas entre um gene ortólogo MRJP (*mrjp9-like*) encontrado nesse *cluster*, assim como em *Bombus terrestris*, que também possui um gene ortólogo MRJP (*BtRJPL/mrjp-like*) (Kupke et al., 2012) com um tempo de divergência próximo ao de abelhas do gênero *Melipona* (Subgênero *Melipona*), entre 17 e 25 milhões de anos atrás (Rasmussen & Cameron, 2010). Análises mais detalhadas são necessárias para entender a função desses genes em Meliponini e se a ausência sucessiva de duplicação gênica no *cluster* das abelhas sem ferrão não levou outros genes a serem cooptados para as funções que as MRJPs de *Apis mellifera* desempenham nesse *cluster*.

Além disso, é interessante destacar o tamanho do *cluster* de *Apis mellifera* (119 kB) contendo nove genes MRJP e cinco genes YELLOW, e de *Melipona quadrifasciata* (55kB) contendo um gene MRJP e quatro genes YELLOW (**Figura 4**). O tamanho do *cluster* em *Melipona quadrifasciata* é relativamente grande considerando o número de genes presentes (5) e uma provável sintenia, sendo pertinente uma análise comparativa das regiões não codificadoras (íntrons) dessas sequências genômicas a fim de identificar variações entre o *cluster* de diferentes espécies que contenham as MRJPs e YELLOWs.

4.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA: PCR CONVENCIONAL

A partir de uma análise comparativa, foram desenhados conjuntos de *primers* que permitisse a análise dos genes de interesse por PCR convencional e quantitativa. Os genomas e transcriptomas de diferentes abelhas, principalmente *Apis mellifera* foram usados para uma melhor aproximação dos genes de *Melipona quadrifasciata*. Visando uma análise mais acurada da expressão desse genes durante o desenvolvimento adulto dessas abelhas, protocolos padrão foram empregados. Assim, a quantidade de cDNA foi padronizada para todas as amostras de glândulas hipofaríngeas a fim de amplificar um único fragmento com o tamanho esperado (**Tabela 2**).

No entanto, foram observados mais de um fragmento para os genes *yellow-h* e *yellow-e3* (**Figura 6**). O desenho dos *primers* é uma etapa sensível e sua especificidade é diretamente dependente da qualidade do genoma (sequenciamento e anotação). O genoma de *Melipona quadrifasciata* ainda apresenta algumas lacunas e a amplificação de alguns genes pode ter sua qualidade comprometida. Ainda assim, o resultado das amplificações estão conforme o esperado para ambos os genes, ou seja, foram amplificados fragmentos de acordo com o esperado. Os fragmentos adicionais são secundários. Os controles não apresentam bandas, o que garante a qualidade da amostra testada (**Figura 6**). A melhor temperatura para amplificação foi 62°C devido a sua alta especificidade, nas 3 amostras. Os fragmentos foram recortados e encaminhados para sequenciamento.

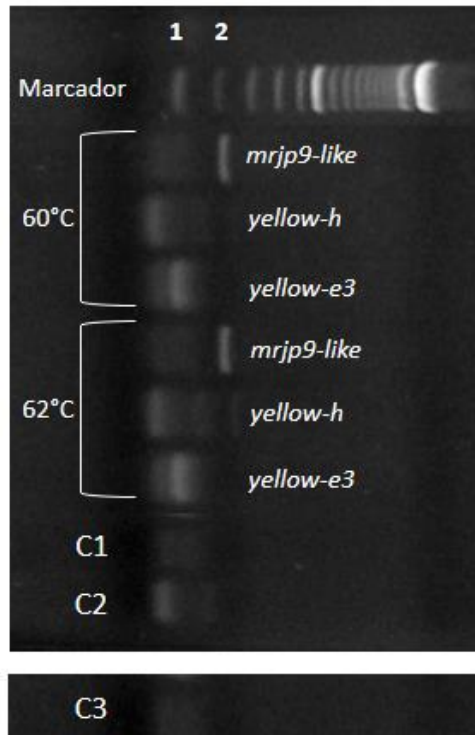


Figura 6 – Resultado da amplificação dos genes *mrjp9-like*, *yellow-h* e *yellow-e3* nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com idades não controladas visualizado em gel de agarose 1,2% corado com UniSafe Dye® - Uniscience (20.000x). A amplificação foi testada em diferentes temperaturas (60°C e 62°C), sendo 62°C a melhor temperatura de amplificação. As bandas do marcador de peso molecular estão representadas por 1: 100pb e 2: 200pb. C1, C2 e C3 (*mrjp9-like*, *yellow-h* e *yellow-e3*) representam os controles sem adição de cDNA.

Todos os pares de *primers* foram testados por PCR convencional usando como molde o cDNA das amostras de glândulas hipofaríngeas de abelhas de um, dez e 22 dias de vida, com diferentes temperaturas e quantidades dos pares de *primers* e cDNA. A amplificação que apresenta fragmentos únicos é do gene *mrjp9-like*. As amplificações que apresentam mais de um fragmento são dos genes *yellow-h* e *yellow-e3*, indicando possíveis quantidades residuais dos *primers*.

4.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA: RT-qPCR

A eficiência dos conjuntos de pares de *primers* desenhados para análise da expressão dos genes candidatos foi testada utilizando as amostras de cDNA das glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de um, dez e 22 dias de vida. Todos os pares de *primers* foram considerados próprios para uso, com um valor de eficiência entre 90% à 110% (Real-time PCR Handbook Thermo Fischer). Os genes de interesse (*mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h*) foram analisados quanto aos níveis de expressão relativa através do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). A média dos valores de C_t das amostras foram calculados para os genes de interesse e para o gene de referência (RpL32). Calculando-se a diferença do valor de C_t entre os genes de interesse e o gene de referência foram obtidos os valores de ΔC_T e por fim, os valores de $\Delta\Delta C_T$ foram obtidos a partir da diferença entre uma amostra de referência e o valor subsequente de ΔC_T das amostras. Os gráficos de expressão relativa foram construídos a partir da média do valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$ das amostras dos genes de interesse, assim como seu erro padrão (**Figura 7, 8, 9 e 10**).

As abelhas operárias com um dia de vida apresentam a expressão de *mrjp9-like* baixa (1,50) quando comparado com o dia dez (3,80) e podendo ser até 14 vezes maior ao dia 22 (14,04) (**Figura 7**). Além disso, sua expressão aumenta ao longo do tempo, tanto em abelhas operárias quanto em machos de um (7,76) e cinco (12,44) dias de vida (**Figura 7 e 8**). Em *Apis mellifera*, a expressão de *mrjp9* é a menor entre todas as MRJPs, não seguindo um padrão de expressão ao longo da vida das abelhas operárias (Dobritsch et al., 2019). Por não mostrar um padrão de expressão nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias, é sugerido que a *mrjp9* não tem relação com o polietismo etário em *Apis mellifera*. Contudo, os resultados de expressão de *mrjp9-like* de *Melipona quadrifasciata* podem sugerir uma relação com o polietismo etário, sendo possível observar um aumento ao longo do tempo, acompanhando a transição de tarefas dos indivíduos. O papel da proteína MRJP9 de *Apis mellifera* no alimento larval ainda permanece desconhecido, sendo a menor quantidade de proteína encontrada no alimento junto com a MRJP8 (Dobritsch et al., 2019). As MRJPs encontradas em maiores quantidades no alimento larval de *Apis mellifera* são a MRJP1-3 e MRJP5 (Dobritsch et al., 2019), podendo desempenhar funções relacionadas a imunidade (Bilikova et al., 2001; Maori et al., 2019; Vezeteu et al., 2017)

e também para formar complexos com outras proteínas relacionadas a viscosidade do alimento, crucial para a sobrevivência das larvas (Buttstedt et al., 2018). Em *Melipona quadrifasciata* o papel da MRJP9-LIKE no alimento larval ainda não está descrito e também, não sabemos se há MRJPs ou outros genes que poderiam desempenhar funções importantes para a sobrevivência dos indivíduos como as MRJPs desempenham em *Apis mellifera*. Investigações aprofundadas são necessárias para avaliar se a MRJP9-LIKE não poderia estar desempenhando as funções em conjunto das outras MRJPs de *Apis mellifera* como um ganho de função ou se outros genes não foram cooptados para estas funções.

A expressão de *yellow-e3* em abelhas operárias apresentou pouca diferença entre o dia um (0,78) e dez (0,76), mantendo-se praticamente constante. Apenas no dia 22 (3,10) é possível perceber um aumento em sua expressão, sendo três vezes maior (**Figura 7**). Em machos, a expressão de *yellow-e3* parece aumentar ao longo do tempo, sendo maior em indivíduos com cinco dias de vida (4,85) quando comparados com indivíduos com um dia de vida (0,84) (**Figura 7 e 9**). Em *Apis mellifera*, é possível encontrar uma alta expressão de transcritos de *yellow-e3* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias alimentadoras, forrageiras e em cabeça de pupas (Drapeau et al., 2006). A função do gene *yellow-e3*, assim como sua proteína permanece desconhecida tanto para *Apis mellifera* quanto para Meliponini. Contudo, a partir dos resultados de expressão em *Melipona quadrifasciata* podemos observar sua expressão presente em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e de machos. Os genes da família YELLOW podem ser encontrados em diversas estruturas e desempenhar diferentes funções (Drapeau, 2003; Drapeau et al., 2006). A expressão do gene *yellow-g* foi identificada em ovários de *Drosophila melanogaster* e *Apis mellifera* (Cardoen et al., 2011; Claycomb et al., 2004), sendo que, esse gene também está presente em *Melipona quadrifasciata*, com função ainda desconhecida. Além disso, o gene *yellow-g* parece estar relacionado a funções reprodutivas, sendo encontrados transcritos desse gene em ovários de *Scaptotrigona bipunctata* (dados pessoais Luna-Lucena, 2019). Pesquisas futuras são necessárias para entender uma possível relação do gene *yellow-e3* e dos outros genes da família YELLOW com a diferenciação de castas, reprodução, funções nutricionais ou até mesmo com a determinação sexual nos indivíduos.

O gene *yellow-h* possui um padrão de expressão diferente dos genes *mrjp9-like* e *yellow-e3*, com uma alta taxa de expressão no dia um (10,51) e 22 (15,48) (Figura 7). O nível de expressão é mais baixo em abelhas operárias com dez dias de vida (7,62) e não parece ter relação direta com o polietismo etário dos indivíduos (Figura 7 e 10). Em *Apis mellifera*, é possível encontrar o gene *yellow-h* expresso apenas na cabeça de larvas de rainhas, podendo ter sua expressão restrita a uma casta específica (Drapeau et al., 2006). Porém, em *Melipona quadrifasciata* sua expressão está presente em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e de machos, não sendo exclusiva apenas em um único sexo.

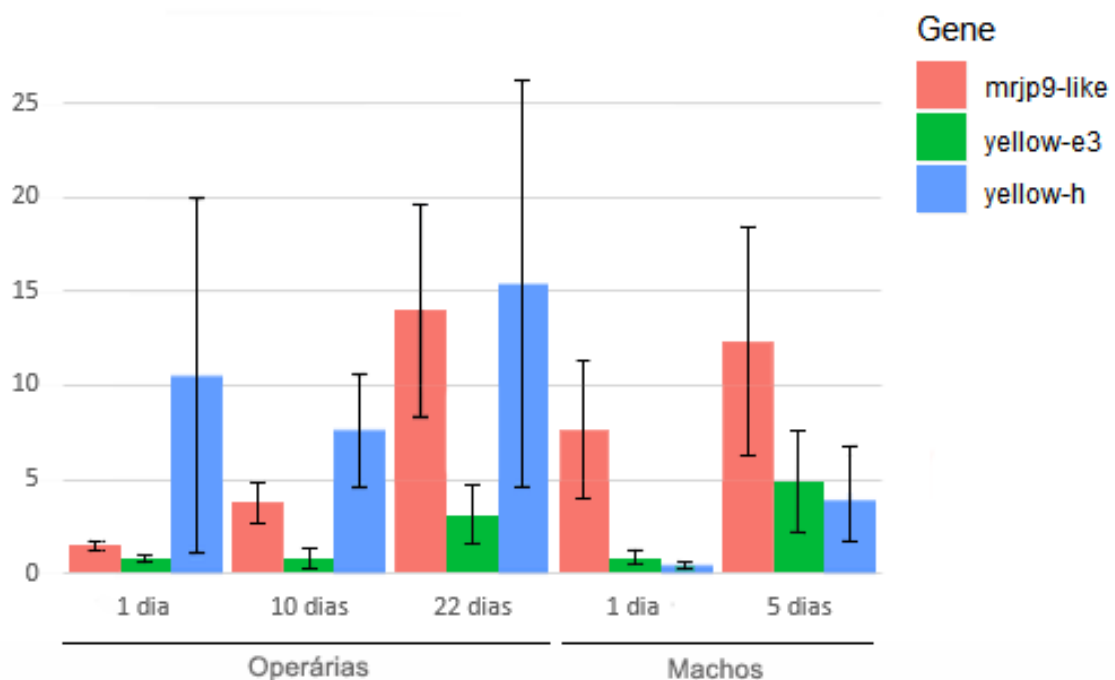


Figura 7 – Expressão relativa dos genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. Os dias estão no eixo x assim como os valores de expressão relativa estão no eixo y e o erro padrão representado pelas barras pretas. A expressão do gene *mrjp9-like* aumenta ao longo do tempo nas amostras de operárias e machos, *yellow-e3* possui maior expressão em 22 dias para operárias e cinco dias para machos assim como *yellow-h*.

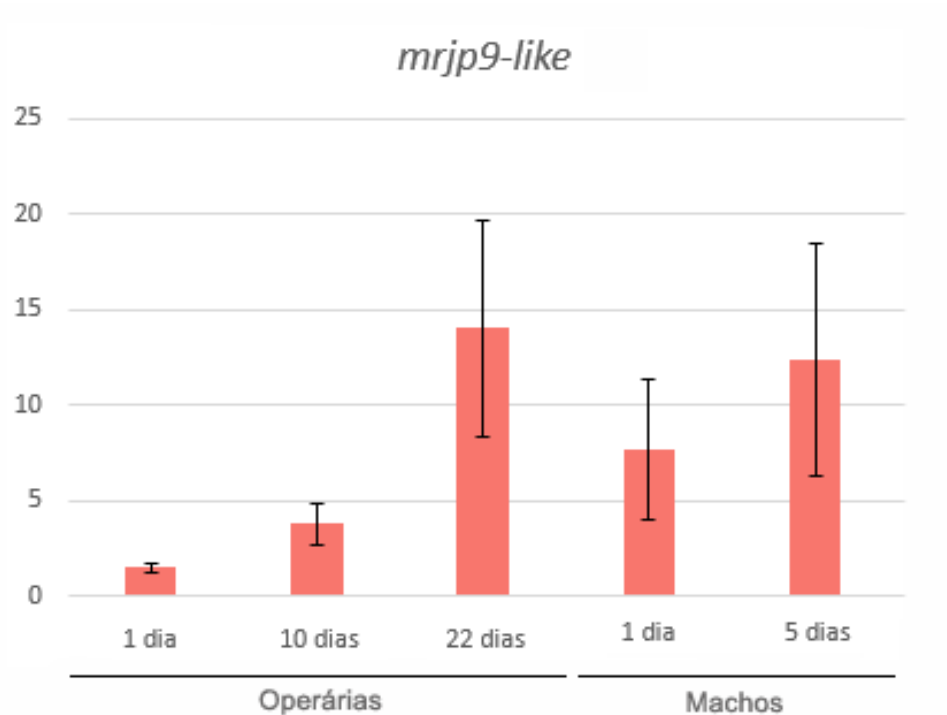


Figura 8 – Expressão relativa do gene *mrjp9-like* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. Os dias estão no eixo x assim como os valores de expressão relativa estão no eixo y e o erro padrão representado pelas barras pretas. A expressão do gene *mrjp9-like* parece ser a única que segue um padrão de expressão de acordo com a idade dos indivíduos ao contrário de *Apis mellifera* (Dobritsch et al., 2019), podendo estar relacionado ao polietismo etário.

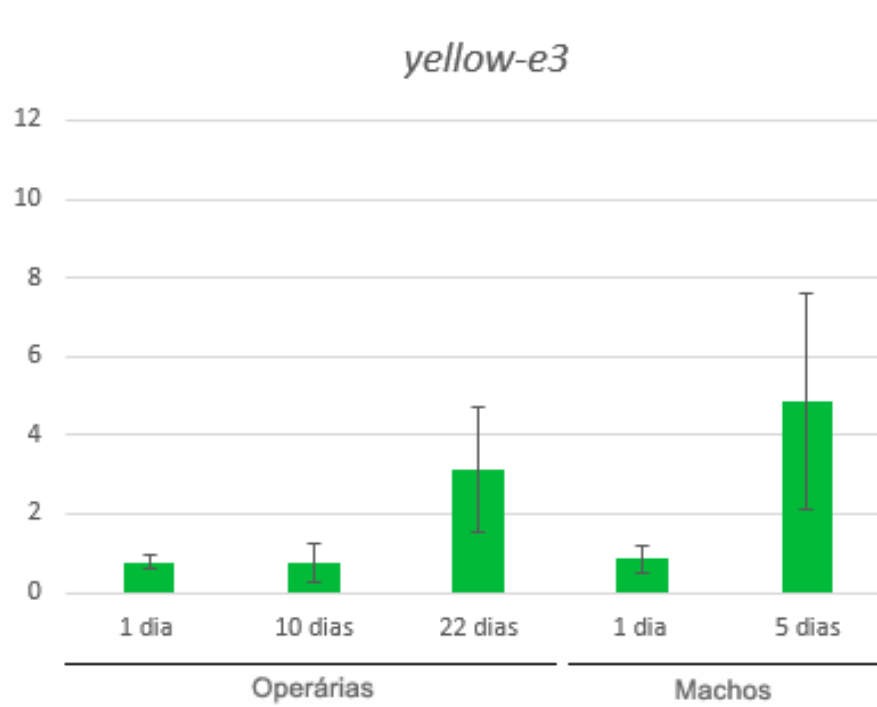


Figura 9 – Expressão relativa do gene *yellow-e3* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. A expressão de *yellow-e3* não parece seguir um padrão de acordo com a idade dos indivíduos, não havendo diferença entre os dias um e dez e com maior expressão em 22 dias para operárias e cinco dias para machos.

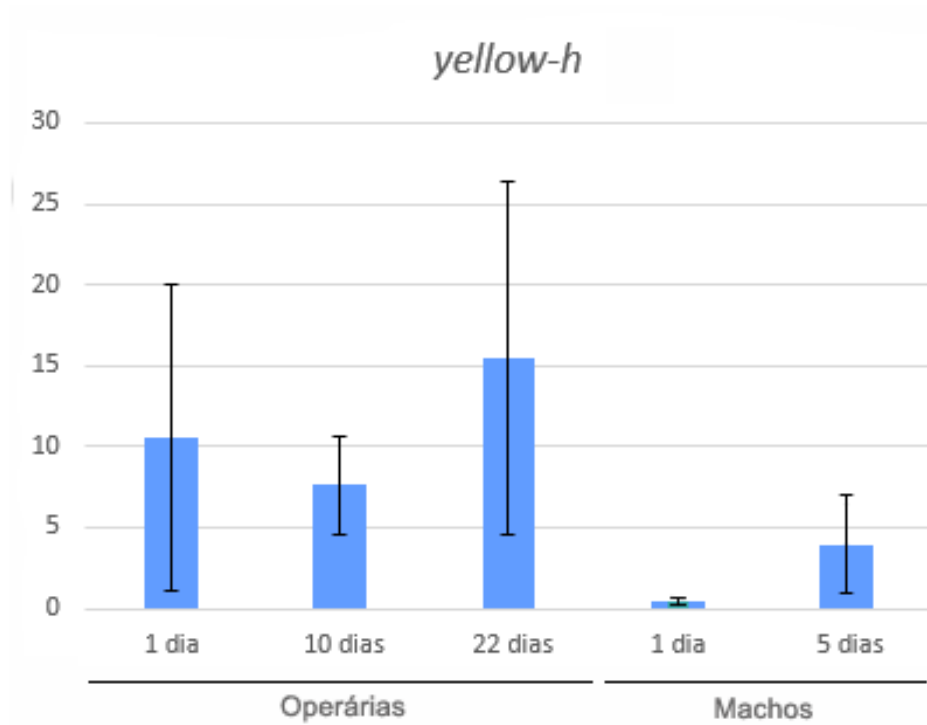


Figura 10 – Expressão relativa do gene *yellow-h* em glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias e machos de *Melipona quadrifasciata* por RT-qPCR. A expressão de *yellow-h* não segue um padrão ao longo do desenvolvimento adulto, sendo mais alta em 22 dias para operárias e cinco dias para machos.

4.5. ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS GLÂNDULAS HIPOFARÍNGEAS DE *MELIPONA QUADRIFASCIATA*

As glândulas hipofaríngeas são estruturas que ocorrem apenas nos Hymenoptera e fazem parte de um conjunto de glândulas exócrinas conectadas a região gnatal. Essas glândulas são frequentemente colocadas na categoria das glândulas salivares, embora as verdadeiras glândulas salivares sejam as labiais (Cruz-Landim & Abdalla, 2002). As glândulas hipofaríngeas são também conhecidas como “glândulas da geleia real, glândulas de operárias, glândulas de alimento e glândulas de alimento larval” (Cruz-Landim & Abdalla, 2002). O termo “glândula hipofaríngea” foi cunhado devido a posição de sua abertura, independentemente de sua função e foi adotado por Snodgrass em 1925 (Snodgrass, 1956).

As glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* variam em tamanho de acordo com a idade devido a diferentes atividades que desempenham em seu contexto social. As abelhas coletadas entre um e dez dias de vida possuem glândulas menores quando comparadas com abelhas de 22 dias de vida. É possível identificar diferenças morfológicas nas glândulas hipofaríngeas ao longo desses períodos, principalmente nos ácinos, estruturas que armazenam as secreções que futuramente irão compor uma parcela do alimento larval. É possível também observar diferenças de tamanho nas glândulas salivares das abelhas operárias, estas também contribuem com uma parcela de suas secreções para compor o alimento larval (**Anexo A – Figura S7 e Figura S8**).

Para orientação, em verde estão destacadas estruturas que possuem na sua composição a actina, proteína encontrada na membrana citoplasmática de células eucarióticas, responsável principalmente pela contração e mobilidade celular. O corante utilizado foi a Faloidina, capaz de interagir com os filamentos de actina, impedindo sua despolimerização (*Alexa Fluor™ 488 Phalloidin – Invitrogen*). Já em azul, estão destacadas as estruturas que possuem na sua composição ácidos nucleicos (DNA), mais especificamente regiões do DNA ricas em adenina (A) e timina (T). O corante utilizado foi o DAPI, capaz de interagir com esses ácidos nucleicos encontrados principalmente no núcleo celular (DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – Thermo Fischer).

As abelhas com até um dia de vida apresentam núcleos lisos (não granulados), agrupados e com citoplasma pequeno, indicando pouca ou nenhuma atividade glandular (**Figura 11**). As abelhas com dez dias de vida apresentam núcleos granulados, menos agrupados e com um citoplasma maior, indicando atividade glandular (**Figura 12**). Por fim, abelhas com 22 dias de vida também apresentam uma condição semelhante às de abelhas com dez dias de vida (núcleos granulados com citoplasmas volumosos), destacando o espaçamento entre os núcleos dos ácinos, indicando que os citoplasmas estão cheios de secreção e que as glândulas estão em atividade (**Figura 13**). A mudança na aparência dos núcleos também pode ser devido a reorganização dos anéis de actina que se movimentam principalmente durante a fase secretora da glândula, em alguns momentos formam verdadeiros cinturões ao redor dos núcleos dos ácinos secretores (Richter et al., 2016).

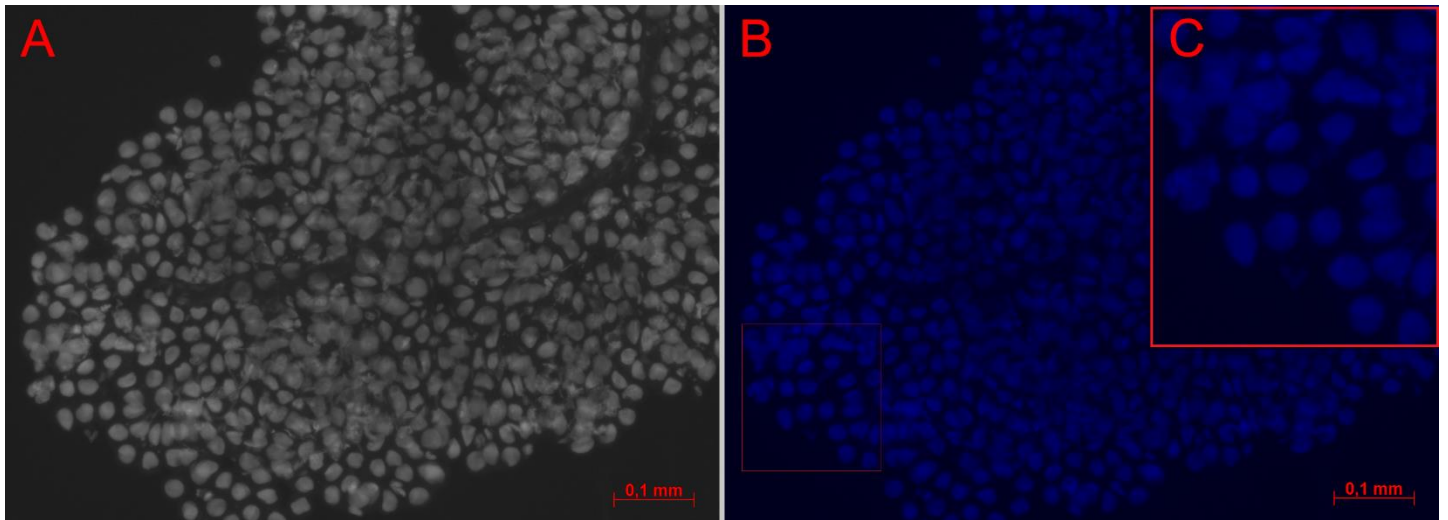


Figura 11 – Glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com um dia de vida. Na imagem é possível ver núcleos grandes dos ácinos, agrupados e com um pequeno citoplasma, indicando pouca atividade glândular. **A:** Sem DAPI, **B:** Com DAPI, **C:** Destaque para os núcleos sem granulação, indicando pouca ou nenhuma atividade.

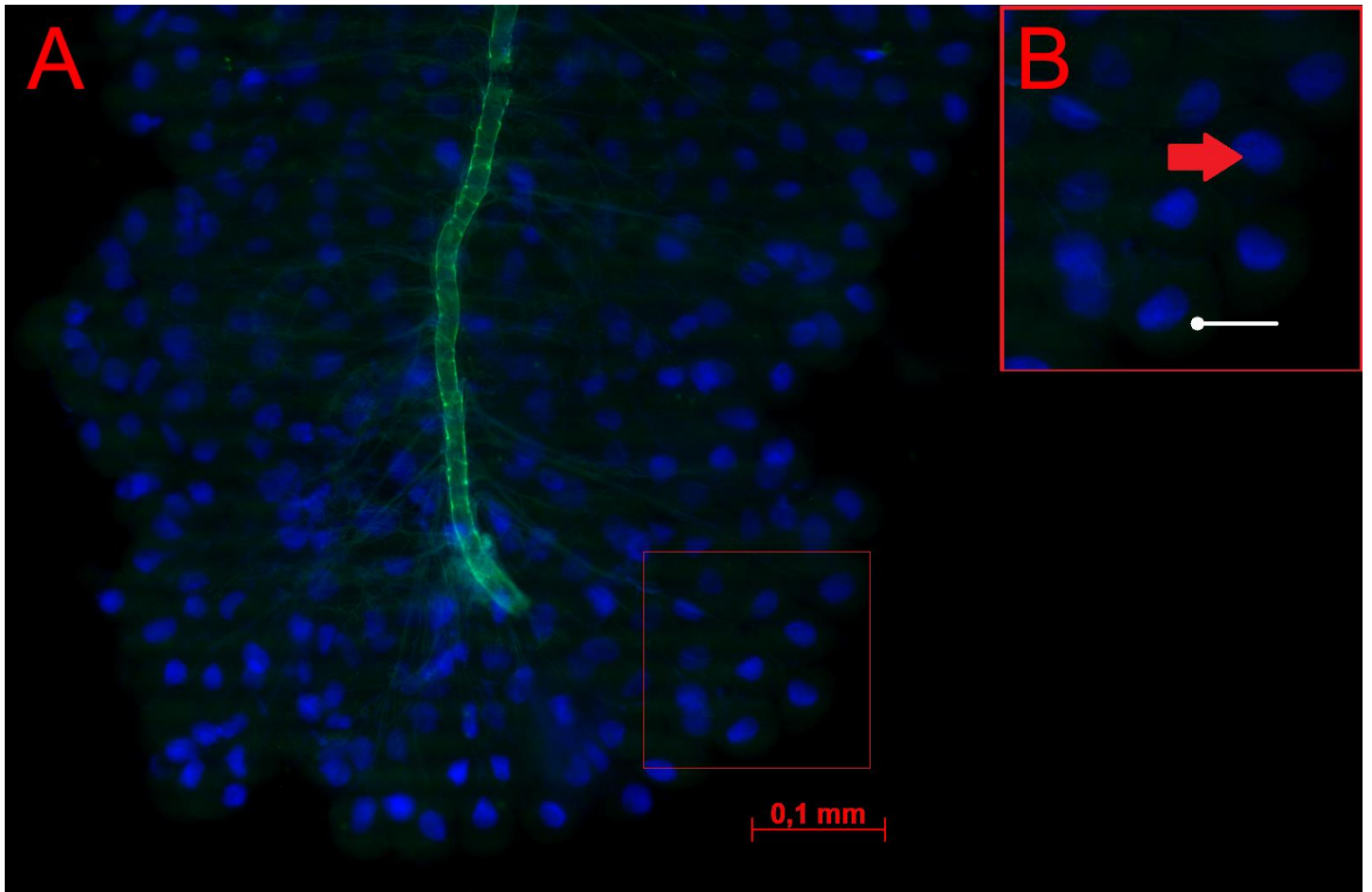


Figura 12 – Glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com dez dias de vida. Em destaque (seta vermelha) estão os núcleos das unidades secretoras, os ácidos (azul) e o ducto axial (**A**: centro, em verde). **B**: É possível perceber núcleos granulados (em atividade) e citoplasmas mais volumosos (comparados com as abelhas operárias de um dia de vida), indicando que as glândulas estão em atividade e cheias de secreção (cabeça de seta em branco).

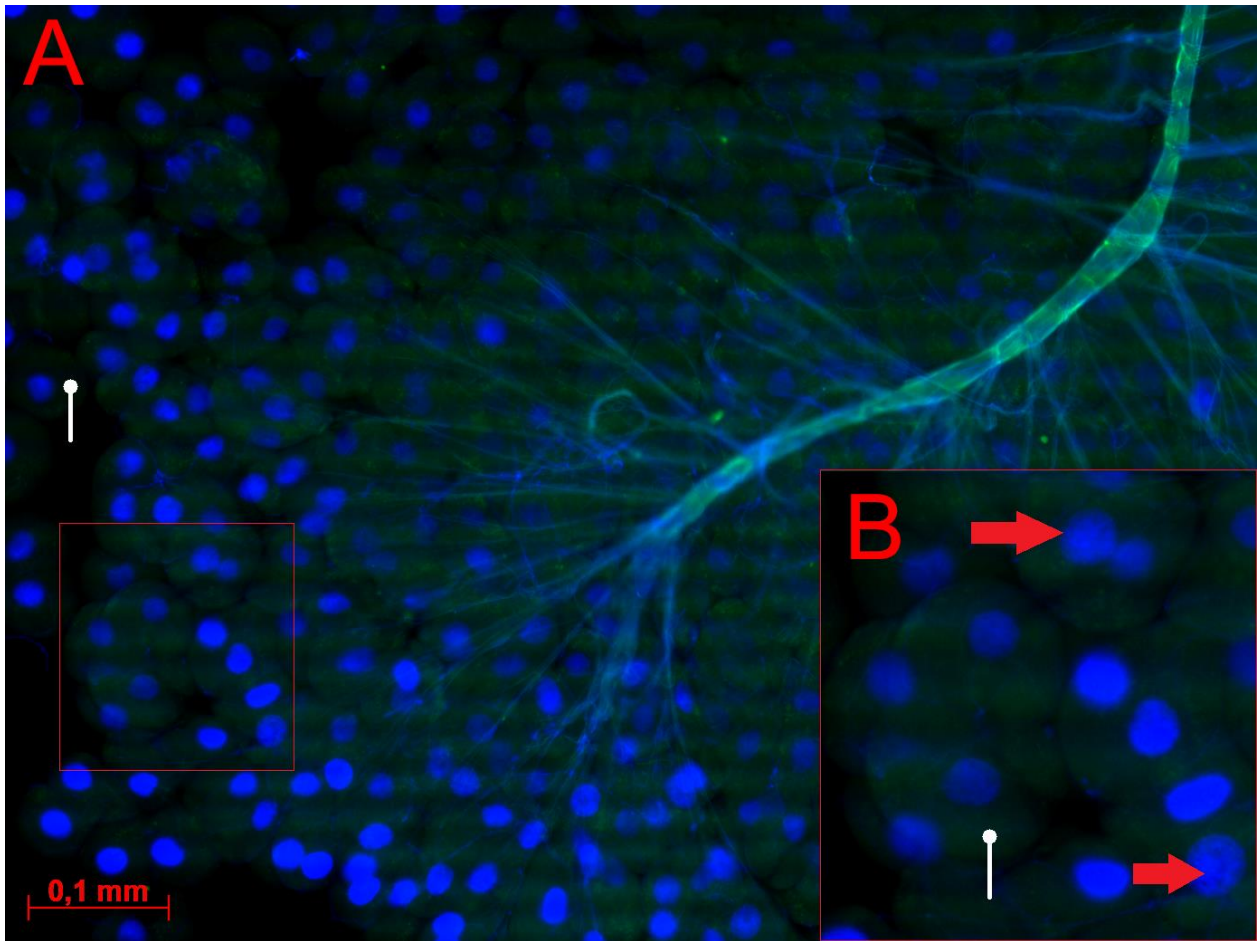


Figura 13 – Glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com 22 dias de vida. Os citoplasmas são maiores quando comparados com as abelhas operárias mais jovens. **B:** Destaque para os citoplasmas cheios de secreção (cabeça de seta em branco). As setas em vermelho apontam a granulação dos núcleos, indicando atividade glandular.

Os resultados obtidos a partir da análise de morfologia parecem ter relação com os resultados obtidos a partir da expressão gênica relativa, uma vez que a expressão dos genes *mrjp9-like* e *yellow-e3* são maiores em abelhas com 22 dias de vida (glândulas hipofaríngeas em alta atividade) quando comparados com abelhas de um e dez dias de vida. As abelhas operárias coletadas aos 22 dias de vida parecem estar desempenhando funções de alimentadoras uma vez que suas glândulas hipofaríngeas apresentam sinal de alta atividade, assim como os genes (*mrjp9-like* e *yellow-e3*) que ali estão sendo expressos. Em *Apis mellifera*, é possível encontrar dados comportamentais (Engels, 1990; Robinson, 1992; Seeley, 1982) e moleculares (Ohashi et al., 1997; Robinson, 1992; Ueno et al., 2009) capazes de diferenciar se as operárias estão desempenhando funções de alimentadoras ou forrageiras em dias

específicos. Já em Meliponini, é possível encontrar estimativas de atividades e ciclo de vida de algumas espécies (Engels, 1990; Gomes, Menezes, & Contrera, 2015; Mateus et al., 2019), sendo difícil generalizar essa informação devido à grande variedade no repertório biológico, ecológico, genético e comportamental encontrado nas abelhas sem ferrão. Contudo, os resultados deste trabalho podem pontuar os dias em que as abelhas operárias estão desempenhando funções de alimentadoras quando comparadas com *Apis mellifera*, que possui um perfil de abelhas alimentadoras de 1-10 dias e forrageiras (>20 dias) (Seeley, 1982).

É importante ressaltar que as atividades desempenhadas pelas abelhas operárias funcionam de acordo com a sinergia de diversos fatores, tais como questões demográficas da colônia, estações do ano e disponibilidade de recursos tróficos. As abelhas operárias analisadas foram coletadas em uma estação seca, o que significa que possuem longevidade reduzida como pode ser visto em *Melipona fasciculata* (Gomes et al., 2015). A longevidade está diretamente relacionada com o tipo de atividade que uma abelha vai exercer ao longo de sua vida, podendo ser variável ao longo do ano devido variações de temperatura e umidade do ambiente. Isso significa que em estações secas as abelhas tendem a sair para forragear mais cedo quando comparado com estações úmidas (Gomes et al., 2015).

5. CONCLUSÕES

Os genes MRJP/YELLOW de *Apis mellifera* podem desempenhar diversas funções nas larvas, estando relacionados a imunidade, diferenciação de castas e reprodução. As funções dos genes MRJP/YELLOW em Meliponini ainda permanecem desconhecidas, contudo, é possível perceber que os genes *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* estão expressos nas glândulas hipofaríngeas de operárias e machos de *Melipona quadrifasciata*. Além disso, a expressão desses genes, principalmente do *mrjp9-like* aumenta quando as abelhas operárias estão em uma idade de 22 dias. Durante o período de dez e 22 dias as abelhas operárias parecem estar desempenhando funções de nutrizes pois suas glândulas hipofaríngeas indicam sinais de alta atividade, sendo que, a tendência é que com o passar do tempo as estruturas secretoras dessas glândulas atrofiem.

A partir da predição dos sítios de fosforilação das sequências gênicas dos membros desse *cluster* foram encontradas quinases relacionadas às vias de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e INSR (*Insulin Receptor*). Essas vias estão associadas ao desenvolvimento e diferenciação de castas em abelhas *Apis mellifera* e pouco se sabe sobre o papel delas em Meliponini. Possivelmente essas vias desempenham funções similares nas abelhas sem ferrão pois são altamente conservadas.

A construção filogenética do *cluster* MRJP/YELLOW em *Melipona quadrifasciata* agrupou os genes *yellow-g*, *yellow-h* e *yellow-e* de ambas as espécies devido à alta similaridade das sequências gênicas. Além disso, os genes *mrjp9/mrjp9-like* e *yellow-e3* de ambas as espécies também foram agrupados devido a suas similaridades, o que já era esperado pois o gene que deu origem as MRJPs foi o gene *yellow-e3* enquanto que, o gene *mrjp9* de *Apis mellifera* e o *mrjp9-like* de *Frieseomelitta varia* e *Melipona quadrifasciata* são os ancestrais entre as MRJPs.

6. REFERÊNCIAS

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... Craig Venter, J. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185–2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Albert, tefan, Spaethe, J., Grubel, K., & Rossler, W. (2014). Royal jelly-like protein localization reveals differences in hypopharyngeal glands buildup and conserved expression pattern in brains of bumblebees and honeybees. *Biology Open*, 3(4), 281–288. <https://doi.org/10.1242/bio.20147211>
- Albert, S., Bhattacharya, D., Klaudiny, J., Schmitzová, J., & Simúth, J. (1999). The family of major royal jelly proteins and its evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 49(2), 290–297. <https://doi.org/10.1007/PL00006551>
- Albert, Š., Klaudiny, J., & Šimúth, J. (1996). Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein RJP571; longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster* yellow protein. *Journal of Apicultural Research*, 35(2), 63–68. <https://doi.org/10.1080/00218839.1996.11100914>
- Ament, S. A., Wang, Y., Chen, C. C., Blatti, C. A., Hong, F., Liang, Z. S., ... Robinson, G. E. (2012). The transcription factor ultraspiracle influences honey bee social behavior and behavior-related gene expression. *PLoS Genetics*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002596>
- Beshers, S.N & Fewell, J. H. (2001). Models Of Division Of Labor In Social Insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 46(1), 413–40.
- Biessman, H. (1985). Molecular analysis of the yellow gene (y) region of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(21), 7369–7373. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.21.7369>
- Bilikova, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klaudiny, J., Simúth, J. (2002). Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters*, 528, 125–129.
- Bilikova, K., Mirgorodskaya, E., Bukovska, G., Gobom, J., Lehrach, H., & Simúth, J. (2009). Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics*, 9, 2131–2138. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800705>
- Bilikova, K., Wu, G., & Simúth, J. (2001). Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*, 32, 275–283.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633–1649. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>
- Brehme, K. S. (1941). The Effect of Adult Body Color Mutations upon the Larva of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- 27(6), 254–261. <https://doi.org/10.1073/pnas.27.6.254>
- Brito, D. V., Silva, C. G. N., Hasselmann, M., Viana, L. S., Astolfi-Filho, S., & Carvalho-Zilse, G. A. (2015). Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to sex and caste development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *66*, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.008>
- Brouwers, E. V. M. (1983). Activation of the hypopharyngeal glands of honeybees in Winter. *Journal of Apicultural Research*, *22*(3), 137–141. <https://doi.org/10.1080/00218839.1983.11100576>
- Brudzynski, K., & Sjaarda, C. (2015). Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides , Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1 , Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120238>
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antibacterial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*, *23*, 329–344.
- Buttstedt, A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2013). More than royal food - Major royal jelly protein genes in sexuals and workers of the honeybee *Apis mellifera*. *Frontiers in Zoology*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-72>
- Buttstedt, A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2014a). Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, *89*(2), 255–269. <https://doi.org/10.1111/brv.12052>
- Buttstedt, A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2014b). Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, *89*(2), 255–269. <https://doi.org/10.1111/brv.12052>
- Buttstedt, A., Mureşan, C. I., Lilie, H., Hause, G., Ihling, C. H., Schulze, S. H., ... Moritz, R. F. A. (2018). How Honeybees Defy Gravity with Royal Jelly to Raise Queens. *Current Biology*, *28*(7), 1095–1100.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.022>
- Cardinal, S., & Danforth, B. (2013). Bees diversified in the age of eudicots. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, *280*, 20122686. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2686>
- Cardinal, S., & Danforth, B. N. (2011). The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. *PLoS ONE*, *6*(6), e21086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021086>
- Cardoen, D., Wenseleers, T., Ernst, U. R., Danneels, E. L., Laget, D., De Graaf, D. C., ... Verleyen, P. (2011). Genome-wide analysis of alternative reproductive phenotypes in honeybee workers. *Molecular Ecology*, *20*(19), 4070–4084. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05254.x>
- Cardoso-Júnior, C. A. M., Fujimura, P. T., Santos-Júnior, C. D., Borges, N. A., Ueira-Vieira, C., Hartfelder, K., ... Bonetti, A. M. (2017). Epigenetic modifications and their relation to caste and sex determination and adult division of labor in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Genetics and Molecular Biology*, *40*(1), 61–68.

<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0242>

- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Cavalcante, V. M., Oliveira, V. T. P. de, & Cruz-Landim, C. da. (2000). Comparative study of wax glands in four Meliponini bees (Hymenoptera, Apidae) producing different quantities of wax. *Iheringia. Série Zoologia*. <https://doi.org/10.1590/s0073-47212000000200010>
- Chandra, V., Oxley, P., Pruneda, I. F., Ritger, A. L., McKenzie, S. K., Libbrecht, R., & Kronauer, D. J. C. (2018). Social regulation of insulin signaling and the evolution of eusociality in ants. *Science*, 2(July), 398–402. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1311222>
- Claycomb, J. M., Benasutti, M., Bosco, G., Fenger, D. D., & Orr-Weaver, T. L. (2004). Gene amplification as a developmental strategy: Isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 6(1), 145–155. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00398-8)
- Corby-Harris, V., Meador, C. A. D., Snyder, L. A., Schwan, M. R., Maes, P., Jones, B. M., ... Anderson, K. E. (2016). Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. *Journal of Insect Physiology*, 85, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.016>
- Corby-Harris, V., & Snyder, L. A. (2018). Measuring Hypopharyngeal Gland Acinus Size in Honey Bee (&em>Apis mellifera) Workers. *Journal of Visualized Experiments*, (139), 6–12. <https://doi.org/10.3791/58261>
- Corby-Harris, V., Snyder, L., & Meador, C. (2019). Fat body lipolysis connects poor nutrition to hypopharyngeal gland degradation in *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 116(September 2018), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.04.001>
- Cruz-Landim, C.; Reginato, R. D.; Imperatriz-Fonseca, V. L. . (1998). Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queen's ovaries with comments on ovary development and caste differentiation. *Papéis Avulsos de Zoologia*.
- Cruz-Landim, C., & F. C. Abdalla. (2002). Glândulas exócrinas das abelhas. Ribeirão Preto, FUNPEC-RP, 181p.
- Dobritsch, D., Aumer, D., Fuszard, M., Erler, S., & Buttstedt, A. (2019). The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*Apis mellifera*) workers' life . *Ecology and Evolution*, (February), 8771–8782. <https://doi.org/10.1002/ece3.5429>
- Drapeau, M. D. (2003). A novel hypothesis on the biochemical role of the *Drosophila* Yellow protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.106>

- Drapeau, M. D., Albert, S., Kucharski, R., Prusko, C., & Maleszka, R. (2006). Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, 16(11), 1385–1394. <https://doi.org/10.1101/gr.5012006>
- Engels, W., I.-F. V. L. (1990). *Caste Development, Reproductive Strategies, and Control of Fertility in Honey Bees and Stingless Bees*.
- Evans, J. D., & Wheeler, D. E. (1999). Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(May), 5575–5580.
- Feldlaufer, M. F., Herbert, E. W., Svoboda, J. A., & Thompson, M. J. (1986). Biosynthesis of makisterone A and 20-hydroxyecdysone from labeled sterols by the honey bee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 3(5), 415–421. <https://doi.org/10.1002/arch.940030502>
- Feldlaufer, M. F., Herbert, E. W., Svoboda, J. A., Thompson, M. J., & Lusby, W. R. (1985). Makisterone A. The major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*, 15(5), 597–600. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0020-1790(85)90120-9)
- Feng, M., Fang, Y., Han, B., Xu, X., Fan, P., Hao, Y., ... Li, J. (2015). In-Depth N - Glycosylation Reveals Species-Specific Modifications and Functions of the Royal Jelly Protein from Western (*Apis mellifera*) and Eastern Honeybees (*Apis cerana*). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00829>
- Ferguson, L. C., Green, J., SurrIDGE, A., & Jiggins, C. D. (2011). Evolution of the insect yellow gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 257–272. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq192>
- Foret, S., Kucharski, R., Pellegrini, M., Feng, S., Jacobsen, S. E., Robinson, G. E., & Maleszka, R. (2012). DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4968–4973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202392109>
- Freitas, F. C. P., Depintor, T. S., Agostini, L. T., Luna-Lucena, D., Nunes, F. M. F., Bitondi, M. M. G., ... Lourenço, A. P. (2019). Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53544-0>
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of Royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11333–11337.
- Garbian, Y., Maori, E., Kalev, H., Shafir, S., & Sela, I. (2012). Bidirectional Transfer of RNAi between Honey Bee and Varroa destructor: Varroa Gene Silencing Reduces Varroa Population. *PLoS Pathogens*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003035>
- Gomes, R. L. C., Menezes, C., & Contrera, F. A. L. (2015). Worker longevity in an

- Amazonian *Melipona* (Apidae, Meliponini) species: effects of season and age at foraging onset. *Apidologie*, 46(2), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0309-y>
- Hammel, B., Vollet-Neto, A., Menezes, C., Nascimento, F. S., Engels, W., & Grüter, C. (2015). Soldiers in a Stingless Bee. *The American Naturalist*, 187(1), 120–129. <https://doi.org/10.1086/684192>
- Hartfelder, K., Makert, G.R., Judice, C.C., Pereira, G.A.G., Santana, W.C., Dallacqua, R., Bitondi, M. M. G. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees Klaus. *Apidologie*. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Hartfelder, K. (1993). Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate Reproduction and Development*, 23(1), 59–74. <https://doi.org/10.1080/07924259.1993.9672294>
- Hoffmann, I. (1960). Untersuchungen über die Herkunft der Komponenten des Königinnenfutters aftes der Honigbienen. *Naturwissenschaften*.
- Hojo, M., Kagami, T., Sasaki, T., Nakamura, J., & Sasaki, M. (2010). Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie*, 41(2), 194–202. <https://doi.org/10.1051/apido/2009075>
- Huang, Z. Y. (1990). A simple in vivo estimation of hypopharyngeal gland activity in honeybees (*Apis mellifera* L., Apidae, Hymenoptera). *J. of Api. Res.*
- Ihle, K. E., Mutti, N. S., Kaftanoglu, O., & Amdam, G. V. (2019). Insulin Receptor Substrate Gene Knockdown Accelerates Behavioural Maturation and Shortens Lifespan in Honeybee Workers, 1–14. <https://doi.org/10.3390/insects10110390>
- Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(3), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0874-7>
- Jordan, K., & Mariño-Ramirez, L. (2007). SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. *Structural Approaches to Sequence Evolution*, (DECEMBER 2006), 0–26. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-35306-5>
- Kamakura, M. (2012). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Seikagaku*, 84(12), 994–1003. <https://doi.org/10.1038/nature10093>
- Kapheim, K. M., Pan, H., Li, C., Salzberg, S. L., Puiu, D., Magoc, T., ... Zhang, G. (2015). Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science*, 348(6239). <https://doi.org/10.1126/science.aaa4788>
- Kim, B. Y., Lee, K. S., Jung, B., Choi, Y. S., Kim, H. K., Yoon, H. J., ... Jin, B. R. (2019). Honeybee (*Apis cerana*) major royal jelly protein 4 exhibits antimicrobial activity. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(1), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.12.020>

- Kimura, M. (1980). A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(1330).
- Kucharski, R., Foret, S., & Maleszka, R. (2015). EGFR gene methylation is not involved in Royalactin controlled phenotypic polymorphism in honey bees. *Scientific Reports*, 5(August), 11–16. <https://doi.org/10.1038/srep14070>
- Kucharski, R., Maleszka, R., Hayward, D. C., & Ball, E. E. (1998). A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften*, 85(7), 343–346. <https://doi.org/10.1007/s001140050512>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, 35(May), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kupke, J., Spaethe, J., Mueller, M. J., Rössler, W., & Albert, Š. (2012). Molecular and biochemical characterization of the major royal jelly protein in bumblebees suggest a non-nutritive function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(9), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.05.003>
- Li, W. (1987). Models of Nearly Neutral Mutations with Particular Implications for Nonrandom Usage of Synonymous Codons. *Journal of Molecular Evolution*, 24, 337–345.
- Li, Z., Mao, R., Teng, D., Hao, Y., Chen, H., Wang, X., ... Wang, J. (2017). Antibacterial and immunomodulatory activities of insect defensins-DLP2 and DLP4 against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10839-4>
- Liu, F., Shi, T., Qi, L., Su, X., Wang, D., Dong, J., & Huang, Z. Y. (2019). lncRNA profile of *Apis mellifera* and its possible role in behavioural transition from nurses to foragers. *BMC Genomics*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5664-7>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Malecová, B., Ramser, J., O'Brien, J. K., Janitz, M., Júdová, J., Lehrach, H., & Šimúth, J. (2003). Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: Computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*, 303(1–2), 165–175. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01174-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01174-5)
- Maleszka, R. (2018). Beyond Royalactin and a master inducer explanation of phenotypic plasticity in honey bees. *Communications Biology*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0004-4>
- Maori, E., Garbian, Y., Kunik, V., Mozes-Koch, R., Malka, O., Kalev, H., ... Shafir, S. (2019). A Transmissible RNA Pathway in Honey Bees. *Cell Reports*, 27(7), 1949–1959.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.073>

- Maori, E., Navarro, I. C., Boncristiani, H., Seilly, D. J., Rudolph, K. L. M., Sapetschnig, A., ... Miska, E. A. (2019). A Secreted RNA Binding Protein Forms RNA-Stabilizing Granules in the Honeybee Royal Jelly. *Molecular Cell*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.010>
- Mateus, S., Ferreira-Caliman, M. J., Menezes, C., & Grüter, C. (2019). Beyond temporal-polyethism: division of labor in the eusocial bee *Melipona marginata*. *Insectes Sociaux*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00040-019-00691-2>
- Michener, C. D. (1974). *The Social Behaviour of the Bees*. Belknap Press of Harvard University Press, Publ., Cambridge, U.S.A., (1), 404.
- Michener, C. D. (2007). *The bees of the world* (2nd ed.). Johns Hopkins University Press.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2011). The CIPRES Science Gateway: A Community Resource for Phylogenetic Analyses, (July). <https://doi.org/10.1145/2016741.2016785>
- Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., ... Sasaki, T. (2004). The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11(1), 27–35. <https://doi.org/10.1093/dnares/11.1.27>
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E., & Amdam, G. V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology*, 5(3), 0673–0677. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Ohashi, K., Natori, S., & Kubo, T. (1997). Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry*, 249(3), 797–802. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00797.x>
- Ohashi, K., Sasaki, M., Sasagawa, H., Nakamura, J., Natori, S., & Kubo, T. (2000). Functional Flexibility of the Honey Bee Hypopharyngeal Gland in a Dequeened Colony. *Zoological Science*, 17(8), 1089–1094. <https://doi.org/10.2108/zsj.17.1089>
- Patel, A., Fondrk, M. K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K., & Amdam, G. V. (2007). The Making of a Queen: TOR Pathway Is a Key Player in Diphenic Caste Development. *PLoS ONE*, 2(6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000509>
- Pinter-Wollman, N., Hubler, J., Holley, J. A., Franks, N. R., & Dornhaus, A. (2012). How is activity distributed among and within tasks in *Temnothorax* ants? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(10), 1407–1420. <https://doi.org/10.1007/s00265-012-1396-2>
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., & Hartfelder, K. (1990). Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 79(1), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90085-Z)
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports

- ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99(1), 206–232. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01341.x>
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S., Denell, R., Beeman, R. W., ... Grossmann, D. (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190), 949–955. <https://doi.org/10.1038/nature06784>
- Richter, K. N., Rolke, D., Blenau, W., & Baumann, O. (2016). Secretory cells in honeybee hypopharyngeal gland: polarized organization and age-dependent dynamics of plasma membrane. *Cell and Tissue Research*, 366(1), 163–174. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2423-9>
- Robinson, G. E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37, 637–665. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. V. D., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers In: Krawetz S, Misener S (eds) Methods and protocols: methods in molecular biology. *Methods in Molecular Biology*, 132(1), 365–386. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>
- Santos, K. S., Delazari Dos Santos, L., Anita Mendes, M., Monson De Souza, B., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2005). Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.10.003>
- Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 11(4), 287–293. <https://doi.org/10.1007/BF00299306>
- Shorter, J. R., & Tibbetts, E. A. (2009). The effect of juvenile hormone on temporal polyethism in the paper wasp *Polistes dominulus*. *Insectes Sociaux*, 56(1), 7–13. <https://doi.org/10.1007/s00040-008-1026-1>
- Smith, C. R., Tóth, A. L., Suarez, A. V., & Robinson, G. E. (2008). Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews Genetics*, 9. <https://doi.org/10.1038/nrg2429>
- Smodiš Škerl, M. I., & Gregorc, A. (2015). Characteristics of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera carnica*) from a nurse colony. *Slovenian Veterinary Research*, 52(2), 67–74.
- Snodgrass, R. E. (1956). Anatomy of the Honey Bee. *Anatomy of the Honey Bee*, (18). <https://doi.org/10.7591/9781501717925>
- Teleman, A. A. (2011). Privileged signaling for brain growth. *Cell*, 146(3), 346–347.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.010>

- The Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, *443*(26), 931–949.
- Ueno, T., Nakaoka, T., Takeuchi, H., & Kubo, T. (2009). Differential Gene Expression in the Hypopharyngeal Glands of Worker Honeybees (*Apis mellifera* L.) Associated with an Age-Dependent Role Change. *Zoological Science*, *26*(8), 557–563. <https://doi.org/10.2108/zsj.26.557>
- Vezeteu, T. V., Bobiș, O., Moritz, R. F. A., & Buttstedt, A. (2017). Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria, (July 2016), 3–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.397>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, *4*(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Winkler, P., Sieg, F., & Buttstedt, A. (2018). Transcriptional control of honey bee (*Apis mellifera*) major royal jelly proteins by 20-hydroxyecdysone. *Insects*, *9*(3), 1–10. <https://doi.org/10.3390/insects9030122>
- Wittkopp, P. J., & Beldade, P. (2009). Development and evolution of insect pigmentation: Genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *20*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.10.002>
- Yamazaki, Y., Kiuchi, M., Takeuchi, H., & Kubo, T. (2011). Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(5), 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.01.005>
- Wilson, E. O. (1971). *The Insect Societies*. Harvard University Press. Cambridge MA. 548p.

ANEXO A

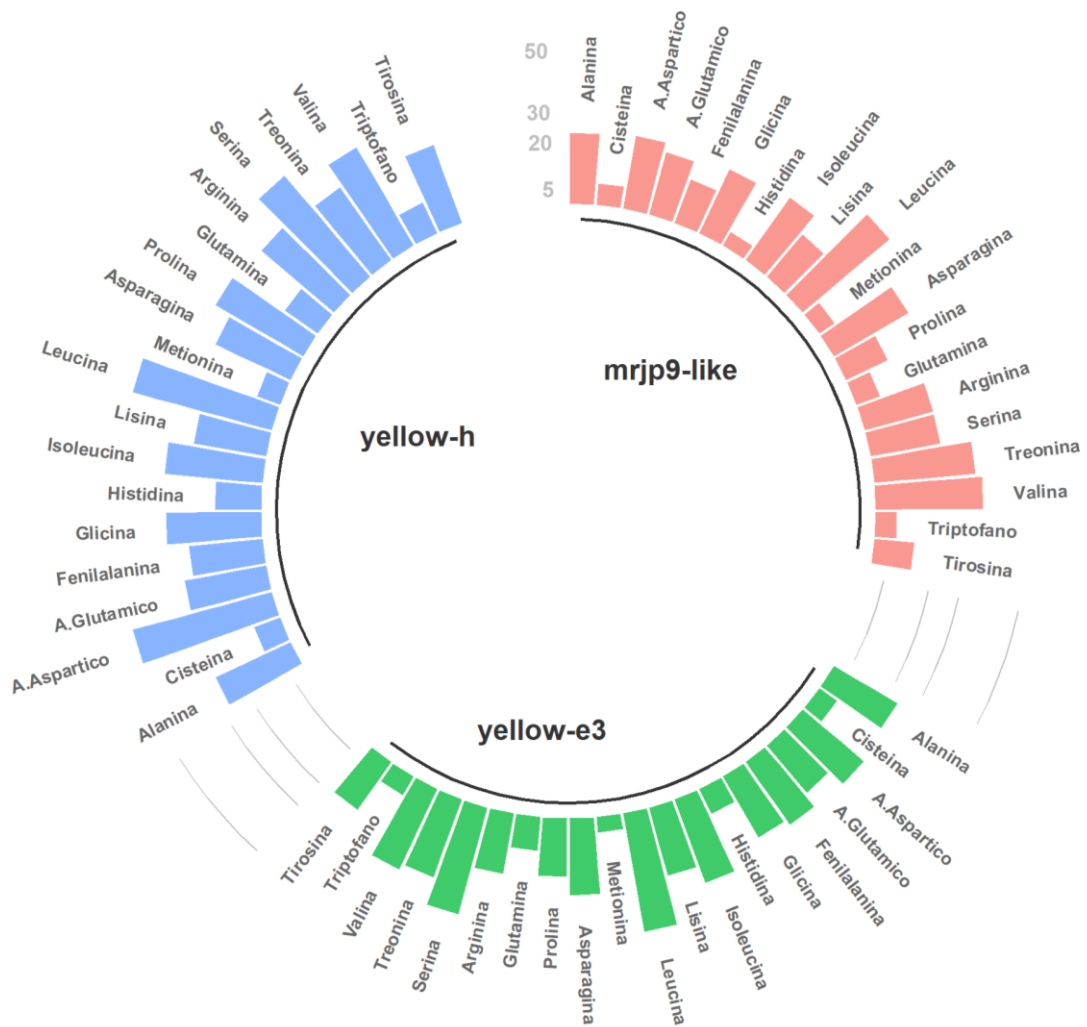


Figura S1 – Aminoácidos presentes nas seqüências das proteínas de *mrjp9-like* e *yellow-e3/h* de *Melipona quadrifasciata*. *Yellow-h* possui a maior seqüência com maiores quantidades de aminoácidos específicos (Leucina e Ácido Aspártico). Os números no topo (5, 20, 30 e 50) indicam as quantidades totais das barras, assim como as linhas cinzas nas laterais.

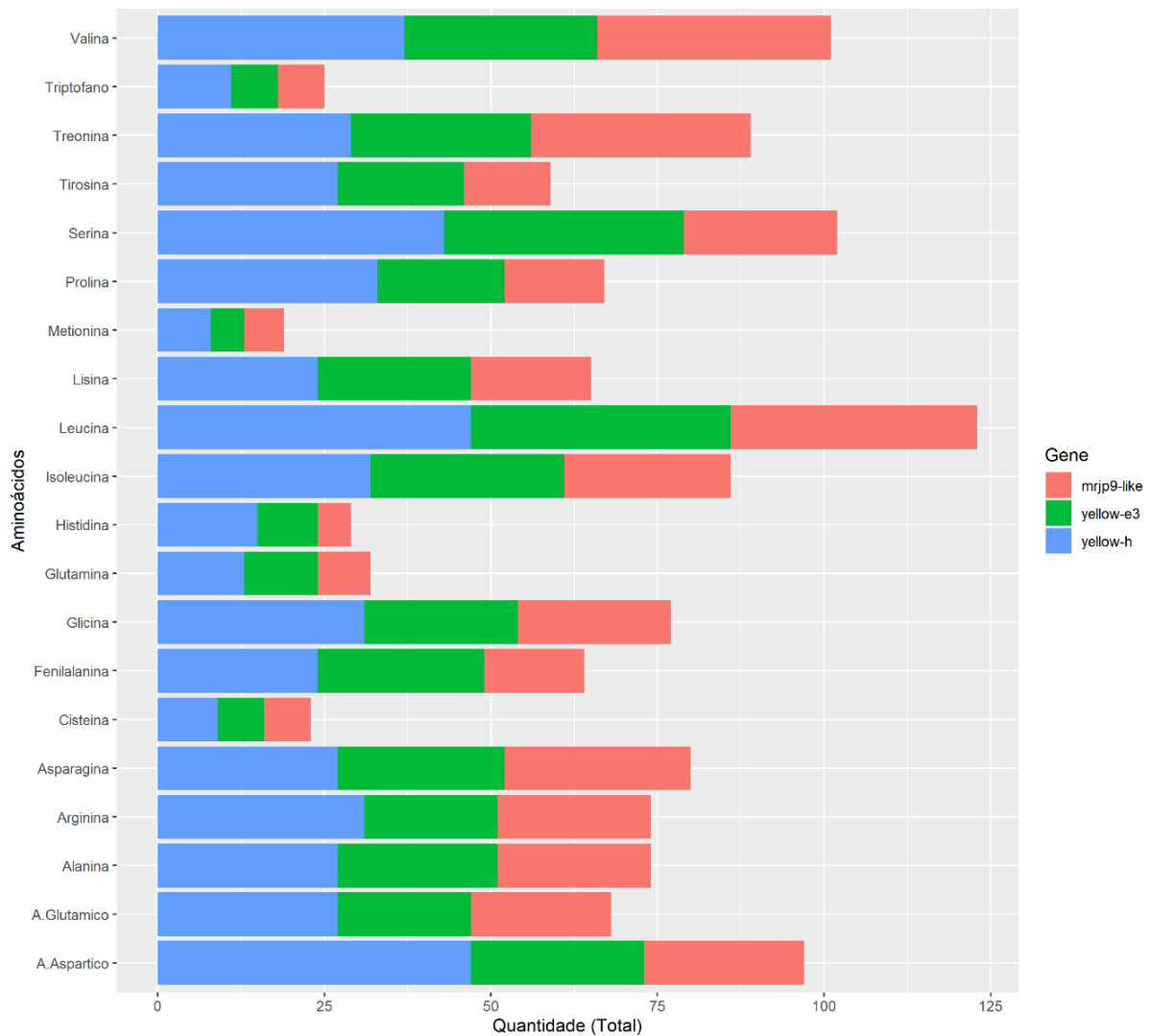


Figura S2 – Quantidade total dos aminoácidos nas sequências de *mrjp9-like*, *yellow-e3* e *yellow-h* de *Melipona quadrifasciata*. Os aminoácidos específicos presentes em grandes quantidades em ambas as sequências são Valina, Serina e Leucina. Esses aminoácidos possuem papéis biológicos importantes relacionados às vias de mTOR e de hipóxia endocelular ([KEGG](#)).

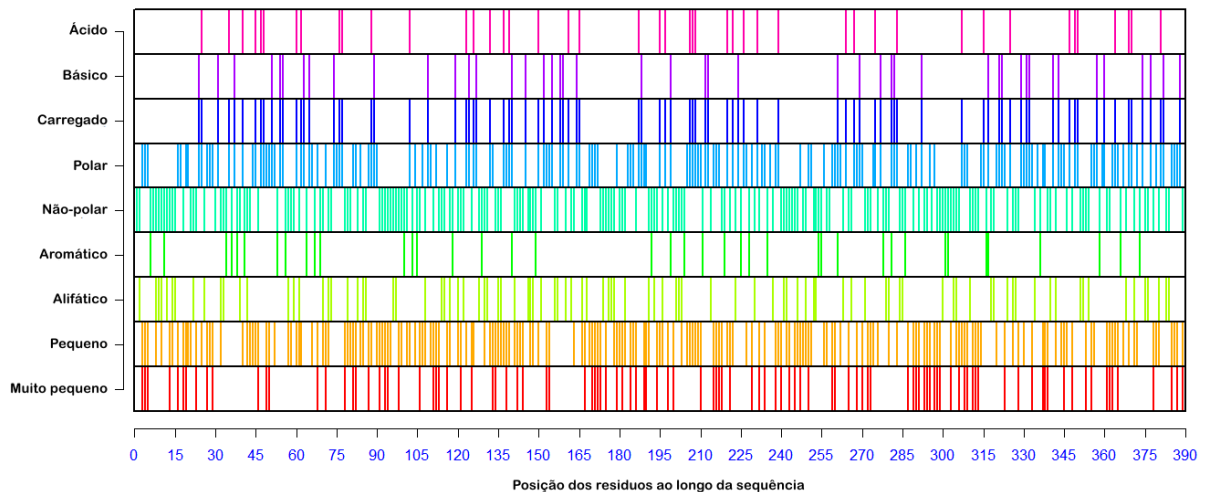


Figura S3 – Propriedades físico-químicas de *mrjp9-like*. Sua sequência é composta majoritariamente por aminoácidos pequenos, básicos, polares e não-polares com um valor calculado de pI (pI -value) de 5.846718. O ponto isoelétrico (pI) representa o pH no qual a carga de uma proteína em meio líquido é 0. Quanto mais próximo de 0 for o ponto isoelétrico (pI) mais ácida é a proteína enquanto que, quanto mais alto for o valor de pI , mais básicos serão seus aminoácidos (M.J. Betts, R.B. Russell. Amino acid properties and consequences of substitutions. In **Bioinformatics for Geneticists**, M.R. Barnes, I.C. Gray eds, Wiley, 2003.).

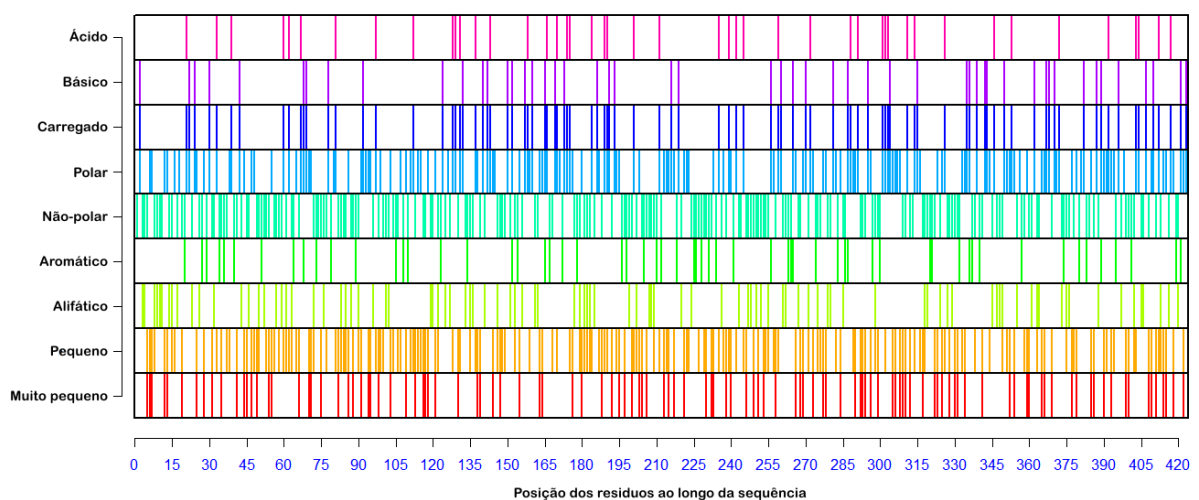


Figura S4 – Propriedades físico-químicas de *yellow-e3*. Sua sequência é composta majoritariamente por aminoácidos pequenos, básicos, polares e não-polares com um valor calculado de pI de 6.325877.

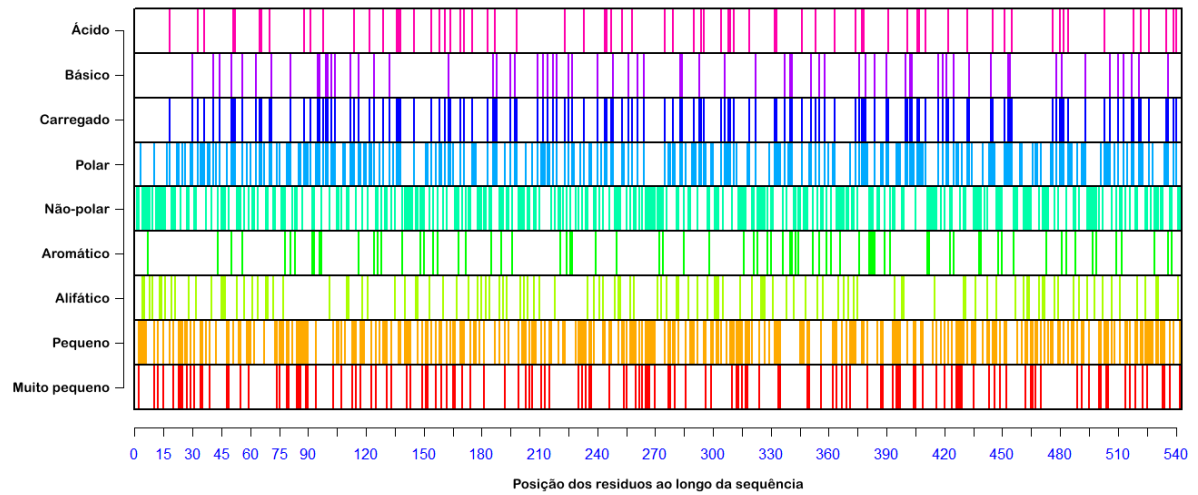


Figura S5 – Propriedades físico-químicas de *yellow-h*. Sua sequência é a maior entre os genes analisados e é composta majoritariamente por aminoácidos pequenos, ácidos, polares e não-polares com um valor pI de 5.257129.

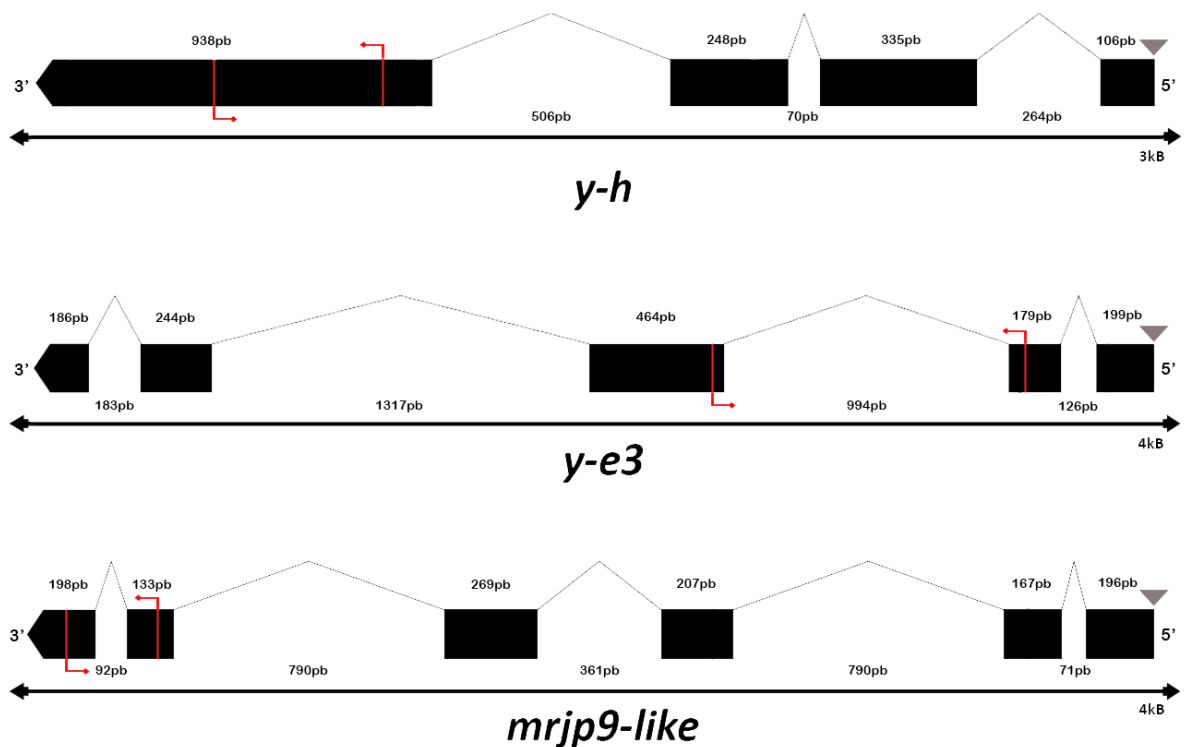


Figura S6 – Estrutura dos genes *yellow-e3/h* e *mrjp9-like*. Os retângulos representam os éxons e as linhas os íntrons. Os tamanhos dos fragmentos estão em pares de base (pb), abaixo das linhas está o tamanho dos íntrons e acima dos retângulos o tamanho dos éxons. As setas vermelhas “↵↗” indicam as regiões em que foram desenhados os *primers forward* “↗” e *reverse* “↵”. O símbolo “▼” indica o códon de iniciação de cada gene.

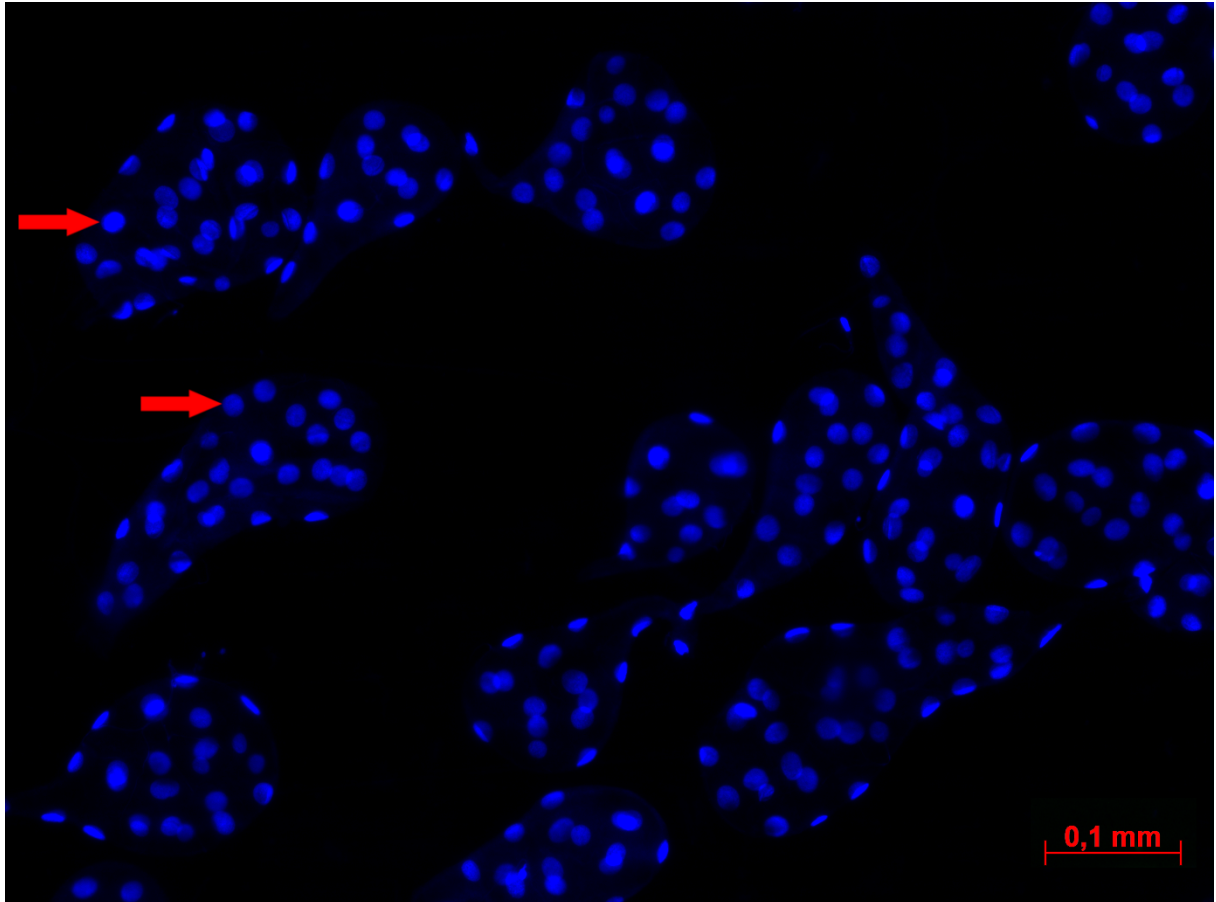


Figura S7 – Glândulas salivares de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com até dez dias de vida coradas com DAPI. As setas em vermelho indicam os núcleos (azul) das estruturas secretoras das glândulas salivares.

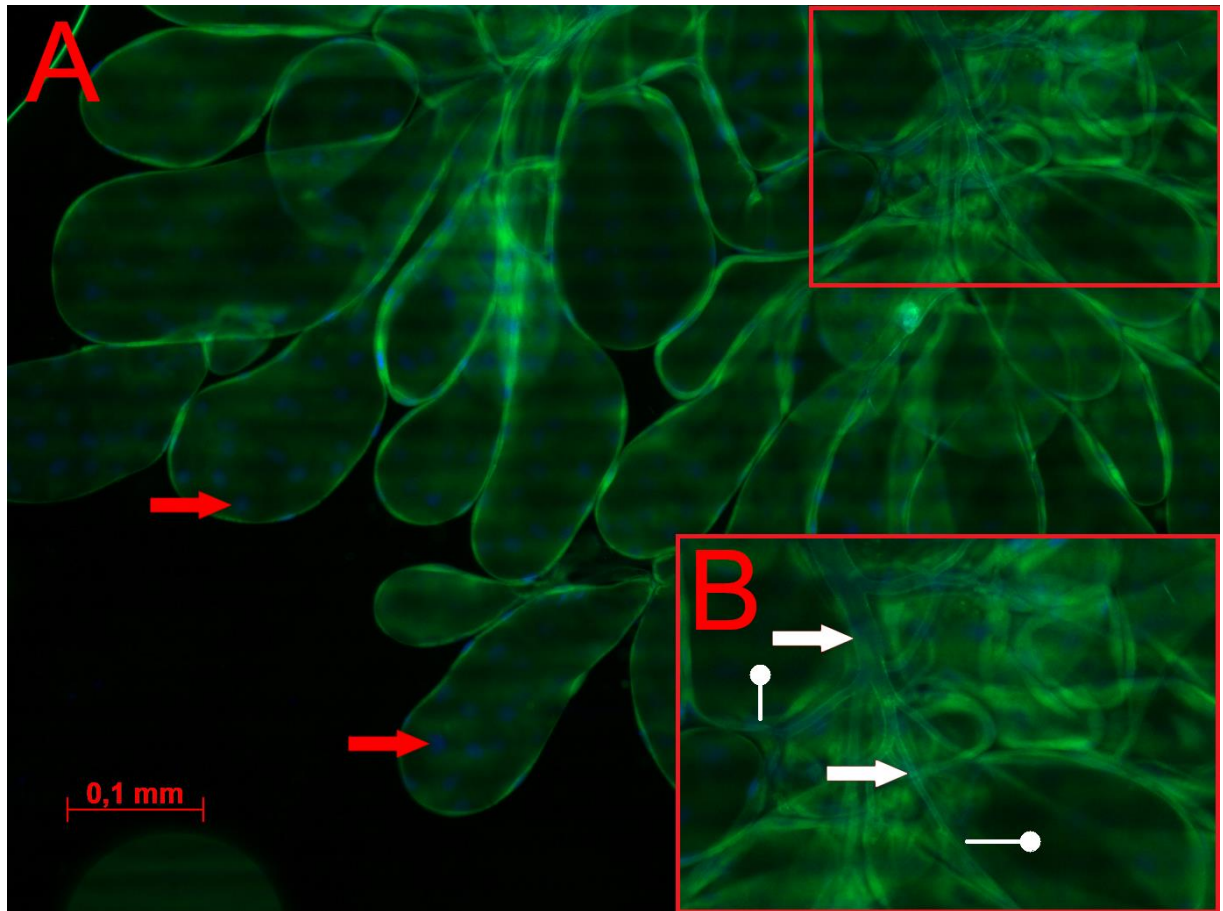


Figura S8 – Glândulas salivares de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* com 22 dias de vida. **A:** As setas em vermelho indicam os núcleos (azul) das estruturas secretoras das glândulas salivares. **B:** As setas em branco indicam os ductos coletores das glândulas salivares e as cabeças de seta, o citoplasma.

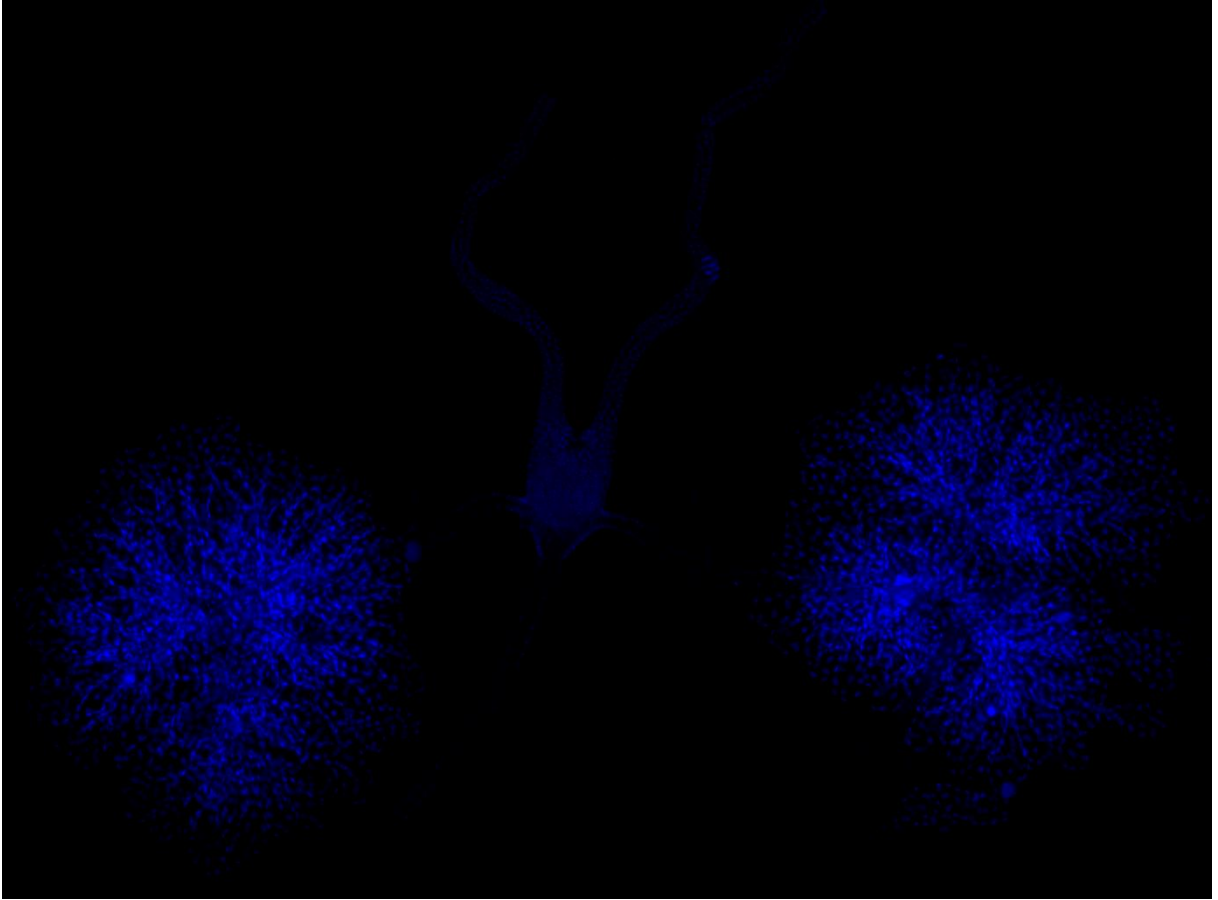


Figura S9 – Glândulas salivares de abelhas operárias de *Melipona quadrifasciata* de idades não determinadas. No centro da imagem é possível identificar a bolsa salivar em formato de “V” e os núcleos (pontos em azul). Nas laterais estão as glândulas salivares assim como os ductos condutores.

ANEXO B

Tabela S1 – Grupos de insetos eussociais e solitários (*) que possuem genes do *cluster* MRJP e ortólogos. A expressão das MRJPs pode ocorrer em diferentes estruturas dentro desses táxons como glândulas hipofaríngeas, glândulas de veneno e corpos cogumelares (Células Kenyon). Além disso, sua função não se restringe apenas às funções alimentares e podem ser expressos tanto em machos quanto em fêmeas (Drapeau et al., 2006).

FAMÍLIA	ORGANISMO	MRJP	MRJP/L	REFERÊNCIA
Apidae	<i>Apis cerana</i>	8	-	Buttstedt et al., 2013; Dapreau et al., 2006
	<i>Apis dorsata</i>	4		
	<i>Apis florea</i>	9		
	<i>Apis mellifera</i>			
	<i>Bombus ignitus</i>	-	1	Kupke et al., 2012; Buttstedt et al., 2013
	<i>Bombus impatiens</i>			
	<i>Bombus terrestris</i>			
	<i>Frieseomelitta varia</i>		1	Kapheim et al., 2015; Busca manual e Anotação genica (Autor)
	<i>Melipona quadrifasciata</i>			
Megachilidae	<i>Megachile rotundata</i> *			Buttstedt et al., 2013
Formicidae	<i>Atta cephalotes</i>		-	6
	<i>Acromyrmex echinator</i>	6		Nygaard et al., 2011; Buttstedt et al., 2013
	<i>Cerapachys biroi</i>	1		Busca manual; Oxley et al., 2014
	<i>Camponotus floridanus</i>			Bonasio et al., 2010; Buttstedt et al., 2013
	<i>Harpegnathos saltator</i>	3		
	<i>Linepithema humile</i>	10		Smith et al., 2011
	<i>Pogonomyrmex barbatus</i>	5		
Pteromalidae	<i>Nasonia vitripennis</i> *		10	Werren et al., 2010

Tabela S2 – Grupos de insetos que possuem genes da família YELLOW. Há uma grande irradiação desses genes ao longo da evolução de Hexapoda.

ORDEM	ORGANISMO	REFERÊNCIA
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>	Drapeau et al., 2006
Diptera	<i>Aedes aegypti</i>	
	<i>Anopheles gambiae</i>	
	<i>Drosophila</i> spp.	
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	Ferguson et al., 2011
	<i>Heliconius</i> spp.	
Hemiptera	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	
Hymenoptera	<i>Atta cephalotes</i>	Suen et al., 2011
	<i>Acromyrmex echinator</i>	Nygaard et al., 2011
	<i>Linepithema humile</i>	Smith et al., 2011
	<i>Pogonomyrmex barbatus</i>	Smith et al., 2011b
	<i>Solenopsis invicta</i>	Buttstedt et al., 2013
	<i>Apis</i> spp.	
	<i>Nasonia vitripennis</i>	
	<i>Megachilidae rotundata</i>	
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Busca manual e Anotação gênica (Autor)
	<i>Frieseomelitta varia</i>	
	<i>Bombus</i> spp.	Kupke et al., 2012