

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**Moléculas reguladoras do crescimento larval e da metamorfose  
em abelhas operárias *Apis mellifera***

**Natália Helena Hernandez**

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2013**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**Moléculas reguladoras do crescimento larval e da metamorfose  
em abelhas operárias *Apis mellifera***

**Natália Helena Hernandes**

**Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes**

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2013**

*Nem o desespero, nem a descrença,  
muito menos o ódio ou alguma ofensa,  
nada me impedirá de viver.*

*Amélia Arnosti Orzari*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Mauro e Rita, que são meu grande exemplo de vida, por tudo que fizeram por mim e por estarem sempre ao meu lado. Vocês sempre me disseram pra eu continuar seguindo meus passos, nunca desistir da felicidade e de meus sonhos. E com certeza esse é um sonho realizado, que eu nunca teria conseguido sem o apoio incondicional de vocês. Obrigado por todos momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pela honestidade, pelo amor e pela amizade. Aos meus irmãos, Tato, Rô e Ju por alegrar a minha vida e por me ajudar a crescer a cada dia. E a toda minha família, que me viu crescer e, pela convivência, ajudou a construir quem sou.

Ao meu querido orientador, Professor Francis, por todo apoio, orientação, paciência para me ensinar e, principalmente, pelos puxões de orelha. Obrigada por toda dedicação e por estar presente sempre que precisei. Pode ter certeza que sem você, não teria me apaixonado tanto pela minha profissão.

Às Professoras Márcia Bitondi e Zilá Simões por ser um exemplo a ser seguido como professoras, pesquisadoras e, sobretudo, como pessoas. Obrigada pelo espaço e material concedido no laboratório, pela amizade e pelas conversas durante todos esses anos. Ao Professor Klaus Kartfelder pela presteza ao disponibilizar reagentes e atenção ao dar sugestões para os tratamentos hormonais.

Aos queridos abelhudos, companheiros de laboratório, Clau, Rodrigo, Camilla, Lili, Ju, Mi, Lívia, Vanis, Tathy, Tiago, Érica, Karina, Flávia, Tita, Daniel, Gustavo e Fer. E a todo pessoal do Apilab. Obrigada por terem me recebido com tanto carinho, pelos momentos de risadas, pelas festinhas, pela paciência em responder todas minhas perguntas e por me ajudarem tanto. Podem ter certeza que vocês tornaram minha iniciação científica muito mais prazerosa. Ao Moysés e a Holly Holt que mesmo de longe deram contribuições para realização deste trabalho.

Ao Rodrigo Faccioli e Leonardo Bortot pela análise de modelagem molecular (interação GCE-HJ).

Às técnicas, Vera e Marcela, por todo auxílio prestado no laboratório e por ter me ajudado sempre que precisei. À Dona Shirley por todo carinho e por deixar o laboratório sempre limpo e organizado. Aos apicultores, Luíz e Rogério, por toda ajuda ao coletar nossas queridas abelhinhas, sem os quais não haveria meios de realizar esse trabalho.

A todos membros da Bio47 que de alguma forma contribuíram para meu amadurecimento. Em especial a Vi, Frá e Bi pelos trabalhos, pelo companheirismo, pelas risadas, pelas fofocas e por tornarem esses anos mais felizes.

Aos meus queridos amigos, Pin, Bê e Jaum, pela amizade maravilhosa de todos esses anos. Obrigada por serem tão especiais na minha vida e por sempre acreditar no meu melhor.

Ao meu namorado, Fê, por todo amor, pela ajuda durante toda minha graduação, pelo apoio nos momentos de crise e por toda a felicidade que você me traz. Obrigada por ser meu melhor companheiro, meu melhor amigo e esse namorado maravilhoso que me ajuda a crescer tanto a cada dia. Obrigada por ajudar a tornar mais esse sonho possível.

À agência financiadora FAPESP, pelo financiamento da pesquisa.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Muito obrigada a todos!

## SUMÁRIO

---

|   |    |
|---|----|
| RESUMO.....   | i  |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 01 |
| 1.1 O crescimento e a metamorfose em insetos holometábolos.....   | 02 |
| 1.2 Hormônios e fatores reguladores do desenvolvimento.....   | 04 |
| 1.3 O modelo de estudo: <i>Apis mellifera</i> .....   | 08 |
| 1.4 Perguntas.....  | 08 |
| 2. OBJETIVOS.....   | 10 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 12 |
| 3.1 Anotação de genes codificadores de proteínas e microRNA.....  | 13 |
| 3.2 Material biológico.....   | 13 |
| 3.3 Tratamentos hormonais.....  | 14 |
| 3.3.1 Tratamento com 20-hidroxiecdisona (20E).....  | 14 |
| 3.3.2 Tratamento com Hormônio Juvenil (HJ III).....   | 15 |
| 3.4 Extração de RNA total.....  | 15 |
| 3.5 Síntese de cDNA.....  | 16 |
| 3.5.1 cDNA para genes codificadores de proteínas.....   | 16 |
| 3.5.2 cDNA para microRNAs.....  | 16 |
| 3.6 Análise de expressão gênica.....  | 17 |
| 3.7 Validação de <i>primers</i> .....   | 19 |
| 3.8 Análise estatística.....  | 19 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 20 |
| 4.1 Identificação genômica e caracterização estrutural dos genes codificadores de proteína e microRNAs.....                   | 21 |
| 4.2 Progressão do crescimento larval.....   | 23 |
| 4.3 Expressão gênica de genes codificadores.....  | 24 |
| 4.4 Expressão de microRNAs.....   | 32 |
| 4.5 Avaliação de tratamento hormonais (HJ ou 20E) sobre o desenvolvimento e expressão de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1 e Kr-h1..... | 42 |
| 4.6 Progressão do desenvolvimento após os tratamentos hormonais.....  | 53 |
| 4.7 Considerações finais.....   | 55 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 57 |

## RESUMO

---

A metamorfose e o crescimento do corpo de insetos holometábolos são processos biológicos caracterizados por alterações genéticas, morfológicas e fisiológicas ao longo do desenvolvimento. Essas alterações são coordenadas pela ação de ecdisteroides e do hormônio juvenil (HJ), que modulam a expressão de genes de maneira tempo- e espaço-específica. Ainda que tenham sido realizados muitos estudos sobre o assunto, especialmente do ponto de vista neuroendócrino, nem todos os circuitos genéticos que regulam tais processos em modelos sociais, como a abelha *Apis mellifera*, estão completamente elucidados. Nós identificamos, no genoma de *A. mellifera*, ortólogos cujos papéis em outros insetos estão relacionados a modulação da sinalização hormonal (GCE [*germ-cell expressed*], Cal [*calponin*], Kr-h1 [*Krüppel homolog 1*] e ftz-f1 [*fushi tarazu - transcription factor 1*]), ao crescimento e à diferenciação (IDGF [*imaginal disc growth factor*]), e à progressão do desenvolvimento (microRNAs: bantam, let-7, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b e miR-281). Analisamos os perfis de expressão desses elementos genético em larvas e na pupa de operárias de *A. mellifera*. Os genes codificadores de proteínas, em particular, foram testados em condições naturais e após tratamento com 20E e HJ. Foram coletadas abelhas, nos estágios larvais L3-L4 (transição equivalente à muda), L4, L4-L5 (transição equivalente à muda), L5 (nas fases de alimentação [F1, F2, F3] e de tecelagem de casulo [S3]), em pupas faratas (PP1 e PP3) e em pupas de olho branco (Pw). Referente ao tratamento hormonal, pupas faratas (PP2) receberam 5 µg de 20E ou 10 µg de HJ. Os indivíduos foram coletados 6 e 24 horas após os tratamentos. Todas as amostras (condições naturais e tratamento hormonal) foram processadas para obtenção de RNA total e síntese de cDNA. Oligonucleotídeos específicos para Cal, GCE, IDGF, Kr-h1 e ftz-f1, bem como para bantam, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b e miR-281 foram desenhados para avaliar seus níveis de expressão por meio RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Os dados foram normalizados por meio da expressão do gene rp49 ou do snRNA U5. O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para as análises de expressão relativa. Verificamos que a expressão de miR-252b é oposta aos títulos de HJ na hemolinfa, indicando um *feedback* negativo entre esses dois reguladores. Os perfis dos demais genes codificadores e microRNAs são bastante similares, com baixa expressão nos períodos de mudas larvais (transição larva-larva) e alta abundância em PP3, logo após o pico ecdisteroides (em PP2), o qual desencadeia a muda metamórfica (transição larva-pupa). O tratamento de 20E inibiu a expressão de GCE, CAL e FTZ-F1, enquanto a expressão de Kr-h1 aumentou após aplicação de HJ. Nossos dados apontam novos atores envolvidos no desenvolvimento larval de operárias de *A. mellifera*, incluindo três microRNAs (miR-252a, miR-252b e miR-281) cujos níveis transcricionais parecem associados aos títulos de HJ. Este estudo reforça a compreensão atual dos fatores genéticos que regem o desenvolvimento pós-embriônico de abelhas, especialmente na sinalização para as mudas larvais (ecdise) e para o comprometimento com a metamorfose.

## ***1.INTRODUÇÃO***

---



## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 O crescimento e a metamorfose em insetos holometábolos

O crescimento corporal e a metamorfose nos insetos são processos biológicos intimamente relacionados e dependentes da nutrição, um fator ambiental. Também, são caracterizados por drásticas alterações genéticas, morfológicas e fisiológicas ao longo da ontogênese.

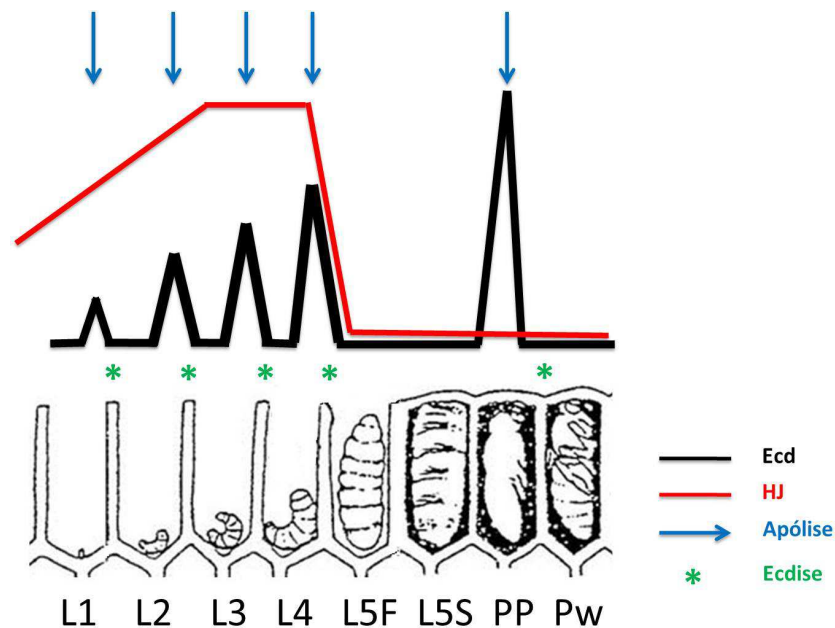
A metamorfose nos insetos holometábolos é dita completa, ou seja, ocorre uma maturação gradual do indivíduo, passando por quatro estágios marcantes de desenvolvimento: embrionário, larval, pupal e adulto (Gilbert et al., 1996).

O estágio larval é um período de intensa alimentação e crescimento rápido. Como consequência do aumento progressivo do corpo, há uma substituição periódica da cutícula (o que é necessária já que esta não é elástica, não podendo expandir-se) que caracteriza os ciclos de muda larvais (larva-larva) e a muda metamórfica (larva-pupa) (Winston 1993).

A cutícula, também conhecida como exoesqueleto, confere proteção contra dessecação e patógenos, serve como ponto de aderência para a musculatura e funciona como um sensor na interação animal-ambiente. A cutícula é sintetizada a partir de secreções da epiderme e juntas (cutícula e epiderme) formam uma estrutura chamada tegumento (Hepburn, 1985).

A sucessão dos quatro estágios de desenvolvimento holometábolo ocorre sob a coordenação de uma eficiente atividade hormonal. Os ecdisteroides (como a ecdisona [E] e a 20-hidroxiecdisona [20E]) e o hormônio juvenil (HJ) são sintetizados e secretados pelas glândulas protorácicas e pelos *corpora allata*, respectivamente e orquestram os eventos ontogenéticos (revisado por Dubrovsky, 2005). A liberação desses hormônios é rigorosamente controlada, o que resulta em pulsos precisos ao longo do desenvolvimento que controlam processos, como a muda e a metamorfose (Thummel, 1995).

Em particular, a ocorrência da transição larva-larva depende de mecanismos de detecção de tamanho (Callier e Nijhout, 2011), pulsos de ecdisteroides no início de cada muda (Kozlova e Thummel, 2000) e também da interação com o HJ (Nijhout, 1994). A Figura 1 esquematiza um provável modelo da ação coordenada desses dois hormônios na progressão do desenvolvimento em abelhas.



**Figura 1** – Desenvolvimento pós-embrionário em abelhas *Apis mellifera*. O esquema ilustra a ocorrência de 4 mudas larvais (L1-L2, L2-L3, L3-L4, L4-L5F) e uma muda metamórfica (L5S-PP-Pw), moduladas pelo balanço entre ecdisteroides (Ecd) e hormônio juvenil (HJ). A amplitude dos picos hormonais não estão em escala, ou seja, não correspondem necessariamente aos seus títulos *in vivo*. L1 a L5 correspondem aos cinco estágios larvais; L5F – larva de 5º estágio em fase de alimentação; L5S – larva de 5º estágio em fase de tecelagem de casulo; PP – pupa farata; Pw – pupa de olho branco. A parte da ilustração contendo as imagens de abelhas em desenvolvimento foi retirada de: <http://www.aginclassroom.org/html/Newsletter/fall2007.html>.

Como se observa, o balanço entre os dois hormônios define cada passo do desenvolvimento (revisado por Dubrovsky, 2005). A presença do HJ direciona a ação de ecdisteroides durante o desenvolvimento pós-embrionário, promove o crescimento, mas mantém o organismo na fase larval e, assim, impede que a muda metamórfica ocorra (Nijhout, 1994). Os ciclos de muda são, portanto, eventos que seguem um padrão cíclico, nos quais a nova cutícula é sintetizada sob a antiga, a qual é subsequentemente eliminada. A apólise é a etapa que marca o início da muda e que se caracteriza pelo desprendimento entre a epiderme e a cutícula velha. Após a síntese de uma nova cutícula ocorre a ecdise, ou seja, o rompimento da cutícula velha (Jenkin e Hinton, 1966).

O intervalo entre a apólise e a ecdise é chamado de farato (encoberto, mascarado), quando se observa o crescimento do organismo envolvido pela cutícula sintetizada no estágio larval anterior (Hinton, 1946). Muitos autores usam o termo **pré-pupa** para designar

a fase imediatamente após o último estágio larval, momento em que a muda metamórfica está ocorrendo. Elias-Neto et al. (2009) ressaltam que esta é uma terminologia mal empregada na literatura e propõem a substituição por **pupa farata**, a qual será adotada no presente trabalho.

Quando o animal atinge o tamanho espécie-específico, os níveis de HJ decaem, permitindo a ocorrência de processos de transformação orgânica que culminam na transição larva-pupa, também chamado de pupação (Truman, 2005). Ao contrário das mudas larvais, que resultam em mudanças de tamanho, a muda metamórfica consiste numa completa modificação na forma, ocorrendo a reorganização de estruturas e substituição de tecidos (Nijhout, 1994; Gilbert et al., 1996; Dubrovsky, 2005). Na transição larva-pupa, ocorre intensa morte celular programada dos tecidos larvais, proliferação e diferenciação de células progenitoras dos discos imaginais e consequente formação dos órgãos do adulto (Edgar e Orr-Weaver, 2001; Ward et al., 2003). Portanto, o tamanho final dos indivíduos adultos é definido no último estágio larval, não havendo crescimento a partir da pupa farata (Nijhout, 2003).

Todos os eventos mencionados acima dependem de uma programação genética finamente modulada. Cascatas de sinalização hierárquicas são desencadeadas pela interação dos hormônios mencionados e seus receptores. De maneira tempo- e espaço-específico, tais cascatas regulam a expressão de inúmeros outros genes, ativando-os ou reprimindo-os ao longo do desenvolvimento (Davidson, 2001).

### 1.2 Hormônios e fatores reguladores do desenvolvimento

O sistema nervoso central de insetos imaturos, além de outros compartimentos como glândulas (os *corpora allata* e as protorácicas) e células neurosecretoras (epitraqueais e Inka), respondem ao aumento e à queda dos níveis hormonais, sintetizando neuropeptídeos e seus receptores de forma coordenada, e garantindo que os processos de crescimento e de mudas ocorram com precisão. Peptídeos e receptores funcionam como fatores hormonais, neurotransmissores e/ou neuromoduladores, e os mais bem estudados são: EH (*eclosion hormone*), ETH (*ecdysis triggering hormone*), PETH (*pre-ecdysis triggering hormone*), *FLRFamides*, MIPs (*myoinhibitory peptides*), GPCRs (*G protein-coupled receptors*), CCAP (*crustacean cardioactive peptide*), ITPs (*ion transport peptides*), e corazonin (Zitnan e Amdams, 2005).

As moléculas acima compõem vias neuroendócrinas que controlam o desenvolvimento, ativando cascatas *downstream* (expressão de genes e vias de sinalização) em diferentes partes do corpo do animal. Tais cascatas são sinais primários que

controlam fatores secundários, que por sua vez também orquestram o crescimento e a metamorfose nos demais tecidos, portanto possuem ação fora do eixo neuroendócrino.

Durante a embriogênese, conjuntos de células epiteliais são especificadas como discos imaginais. Na fase larval, as células dos discos imaginais se proliferam em larga escala e, a partir desse tecido, desenvolvem-se estruturas importantes para a vida adulta (asas, antenas, apêndices locomotores etc.). Insetos mutantes que carecem de discos imaginais apresentam atrasos no desenvolvimento, isto sugere que existe nessas células um mecanismo que responde ao *status* nutricional, e que coordena o crescimento e a liberação de ecdisteroides (revisado por Rewitz et al., 2013).

Kawamura et al. (1999) caracterizaram fatores de crescimento em cultura de células de discos imaginais de *Drosophila melanogaster*, os quais chamaram de genes da família IDGF (*imaginal disc growth factor*). As sequências nucleotídicas e proteicas dos IDGFs se assemelham às quitinases, mas se diferem dessas últimas pela substituição de um resíduo de ácido glutâmico por uma glutamina na porção C-terminal e, assim, as IDGFs perderam funções enzimáticas.

Outro gene que está diretamente envolvido com a manifestação dos efeitos hormonais é o *Methoprene-tolerant* (Met). Met codifica um fator de transcrição contendo os domínios bHLH-PAS. Ambos os domínios bHLH (helix-loop-helix, [cl00081]) e PAS ([cd00130]) pertencem a famílias de ligantes, onde o primeiro apresenta propriedades de dimerização e ligação ao DNA enquanto o segundo é descrito como sensor de luz e oxigênio.

Experimentos envolvendo drosófilas mutantes *Met*<sup>-</sup> revelaram uma diminuição da ligação citoplasmática entre Met e HJ, sendo a primeira indicação de que esta proteína possa ser um receptor hormonal (Wilson e Fabian, 1986; Shemshedini e Wilson, 1990). No entanto, um novo candidato a receptor de HJ emergiu nos últimos anos. Godlewski et al. (2006) demonstraram em cultura de células S2 de *D. melanogaster* que Met pode formar um heterodímero com seu parálogo GCE (germ-cell expressed bHLH-PAS) e, também, a interação Met-GCE diminui quando se adiciona HJ ao cultivo.

A proteína GCE em *D. melanogaster*, apresenta 60% de identidade de aminoácidos com Met (Ledent e Vervoort, 2001). Usando ferramentas de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), Li et al. (2010) identificaram apenas um ortólogo de Met/GCE nos genomas dos insetos *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Nasonia vitripennis* e *A. mellifera*. Evidências filogenéticas e de estrutura genômica indicam que GCE seja o gene ancestral, o qual se duplicou em alguns insetos como espécies do gênero *Drosophila* e *Bombyx mori*, originando Met (Wang et al., 2007). No entanto, como tal duplicação não é

universal entre os insetos, sugere-se que o gene seja chamado de GCE nas espécies com apenas uma cópia (Li et al., 2010).

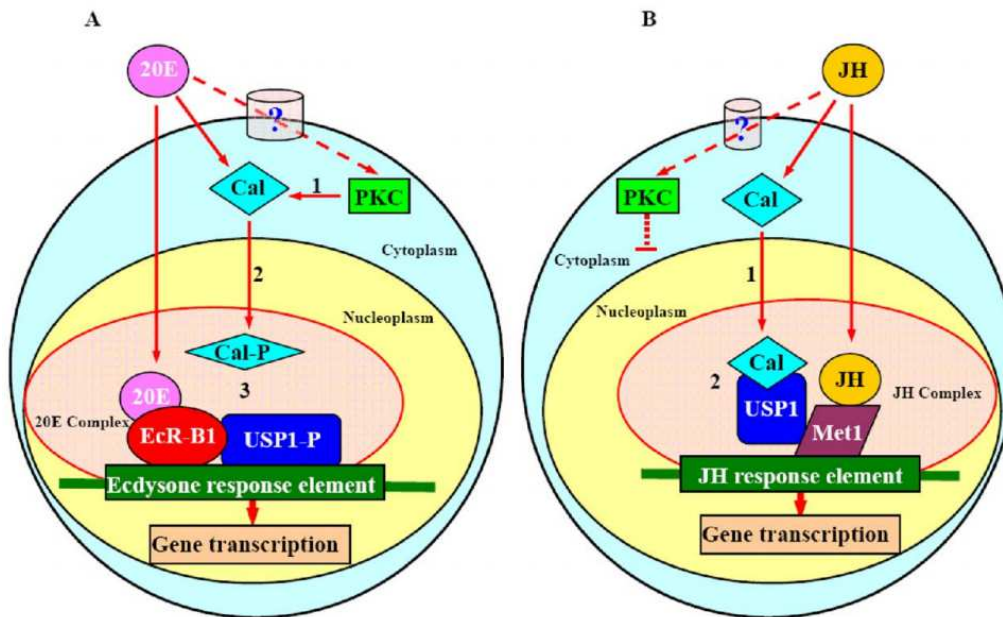
Durante as fases larvais, Met medeia a ação do HJ pela ativação de um alvo precoce desse hormônio, o Kr-h1 (*Krüppel homolog 1*), cuja função é a de inibir a metamorfose prematura, como demonstrado em *D. melanogaster* (Minakuchi et al., 2008) e *Tribolium castaneum* (Minakuchi et al., 2009).

Outro componente essencial na sinalização de HJ é o FTZ-F1 (*fushi tarazu - transcription factor 1*). Dubrovsky et al. (2011) descobriram que FTZ-F1 interage com os candidatos a receptor do HJ (Met e/ou GCE), podendo ativar a transcrição do gene codificador de E75A. FTZ-F1 parece desempenhar um papel como intermediário ou regulador na sinalização da interação entre 20E e HJ durante o desenvolvimento, pela sua capacidade de interagir tanto com os receptores de 20E quanto de HJ (Dubrovsky et al., 2005).

Mais recentemente, um estudo *Helicoverpa armigera* demonstrou que o gene Calponina (Cal, também chamado de Chd64) desempenha um papel importante na interação entre 20E e HJ (Liu et al., 2011). O gene Cal codifica uma proteína que possui um domínio Chd (*Calponin homology domain*, [cd00014]). Tal domínio é encontrado em proteínas envolvidas em transdução de sinal e de citoesqueleto.

Os dados de Liu et al. (2011) culminaram num modelo de ativação gênica nuclear mediada pela integração de hormônios e proteínas. Segundo o modelo (Figura 3), Cal participa tanto da via de sinalização de HJ quanto de 20E, em função da alternância do seu estado de fosforilação.

Na última década, uma classe de RNAs não-codificadores conhecida por microRNAs (miRNAs) emergiu como reguladores da expressão gênica, atuando, na maioria das vezes, de forma a degradar um RNA mensageiro alvo ou impedir a sua tradução, tendo assim um efeito repressor sobre essas moléculas e regulando, conseqüentemente, diversos processos biológicos (Ambros, 2001; revisado por Lucas e Raikhel, 2013 e Asgari, 2013). Dentro dessa classe de moléculas reguladoras o miRNA let-7 é um dos mais bem caracterizados até o momento, com papel chave na regulação temporal (*timing*) do desenvolvimento do nematoide *Caenorhabditis elegans* (revisado por Frasch, 2008), de *D. melanogaster* (Bashirullah et al., 2003; Sempere et al., 2003) e de *B. mori* (Liu et al., 2007). O fator de transcrição *Broad-complex* (Br-C), um dos fatores induzidos por 20E, é um importante ativador da expressão dos microRNAs let-7 juntamente com miR-100 e miR-125. Juntos, esses elementos formam um complexo cuja atuação é fundamental para o início da muda metamórfica em *D. melanogaster* (revisado por Asgari, 2013).



**Figura 3** – O papel da Calponia (Cal) na via de sinalização de ecdisteroides (20E) e hormônio juvenil (HJ). **A.** Via do 20E: Fosforilação da proteína Cal por PKC através de um caminho ainda desconhecido (1); Cal é translocada para o núcleo (2); Cal fosforilada não se liga com ultraspiracle (USP) fosforilado (3). EcR liga 20E e USP e outras proteínas chaperonas para formar um complexo transcricional que se associa ao *motif* de resposta a ecdisona presente no promotor de alguns genes, os quais serão transcritos. **B.** Via do HJ: HJ mantém Cal não-fosforilada, translocando-o para o núcleo (1); a forma não-fosforilada de Cal se liga com USP não-fosforilado (2), Met se liga com HJ e interage com USP e outras proteínas chaperonas e, em seguida, este complexo se liga ao elemento de resposta ao HJ para iniciar a transcrição de genes responsivos ao complexo (Retirado de Liu et al., 2011).

Em insetos, a atuação do miRNA bantam promove a indução do crescimento de tecidos (Brennecke et al., 2003; Nolo et al., 2006; Herranz et al., 2012). Em *D. melanogaster*, bantam reprime a diferenciação das células germinativas, garantindo a manutenção dessas células nos ovários (revisado por Asgari, 2013). Recentemente, Boulan et al. (2013) descobriram que bantam promove o crescimento ao inibir a liberação de ecdisteroides. Bantam apresenta, nesse contexto, um papel antagônico ao complexo let-7, miR-100 e miR-125.

Em *B. mori*, o miR-281 é expresso em vários tecidos durante a metamorfose (Liu et al., 2010), no entanto, a sua função exata ainda não foi completamente esclarecida. Outros microRNAs como miR-8 também estão envolvidos na metamorfose de *D. melanogaster* (Sempere et al., 2003; Bashirullah et al., 2003; Kennell et al., 2012). Larvas de *D. melanogaster* que apresentam deficiência de miR-8, possui defeitos na via de insulina e apresentam menor tamanho corporal. Sendo assim, miR-8 um papel importante na ativação

da via de insulina no corpo gorduroso, que promove o crescimento corporal do inseto (revisado por Lucas e Raikhel, 2013). Em *Blattella germanica* verificou-se o mesmo padrão de resposta para let-7, miR-100 e miR-125 encontrado em *D. melanogaster*, aumentando em resposta ao 20E, o que denota o grau de conservação filogenético desse complexo (Rubio et al., 2012). Também se descobriu que, em *B. germânica*, o microRNA miR-252 é inibido em resposta ao tratamento com 20E no último estágio ninfal, estando também envolvido no processo de metamorfose nesse inseto (Rubio et al., 2012).

### 1.3 O modelo de estudo: *Apis mellifera*

A metamorfose em abelhas *A. mellifera*, um organismo holometábolo, também se dá por ciclos de crescimento e mudas, influenciados por hormônios (Winston, 1993).

Em uma colônia vivem uma única rainha, cerca de 10-30 mil operárias facultativamente estéreis, e de zero a alguns milhares de zangões, dependendo da época do ano. As operárias são responsáveis por todas as tarefas ligadas à vida da colmeia (divisão de trabalho). A rainha poliândrica (acasalamento com vários machos), além de controlar as atividades da colmeia, é a fêmea reprodutora e, portanto, origina todos os indivíduos da colônia (Winston, 1993; Page e Peng, 2001).

Ovos não-fecundados (haploides) originam zangões. Ovos fecundados (diploides) dão origem às fêmeas, as quais são bipotentes até o terceiro dia de vida larval, podendo diferenciar-se em rainhas ou operárias dependendo da dieta recebida. As larvas que são alimentadas apenas com geleia real (secreções das glândulas hipofaringeanas) crescem e ganham peso em ritmo acelerado, desenvolvendo-se em rainhas. Larvas alimentadas com uma mistura de geleia real, pólen e mel, apresentam uma taxa de crescimento mais lento, pesam menos e se desenvolvem em operárias (Winston, 1993; Page e Peng, 2001).

### 1.4 Perguntas

Ainda que muitos estudos tenham sido feitos sobre o desenvolvimento de insetos, especialmente do ponto de vista neuroendócrino, nem todos os circuitos genéticos que regulam o crescimento e a metamorfose de insetos holometábolos estão completamente elucidados. Há necessidade de se explorar um número maior de componentes moleculares, bem como outras espécies de insetos, especialmente aquelas com particularidades ligadas ao estilo de vida. No contexto da diversidade de estilos de vida dos insetos, a abelha *A. mellifera* destaca-se por ser um organismo altamente social e como um excelente modelo para estudos de biologia do desenvolvimento, em particular sobre questões relativas à genética da metamorfose. Os genes e miRNAs descritos acima para outras espécies estariam envolvidos na regulação do processo metamórfico na abelha *A. mellifera*? Seus

perfis de expressão são coerentes com o desenvolvimento pós-embrionário e eventos de diferenciação deste período?



## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

---

Com intuito de responder as perguntas acima, os objetivos desse trabalho foram:

- Caracterizar o perfil de expressão de microRNAs (let-7, bantam, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b e miR-281) e de genes codificadores de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1 e Kr-h1 durante parte do desenvolvimento larval e na pupa, incluindo os períodos de mudas larvais e a muda metamórfica, de operárias da abelha *Apis mellifera*.
- Verificar o efeito dos tratamentos com HJ e 20E na expressão e genes codificadores de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1 e Kr-h1.

### ***3.MATERIAL E MÉTODOS***

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1. Anotação de genes codificadores de proteínas e microRNA

Ortólogos de *Drosophila melanogaster* para os genes Cal (Chd64 ou CG14996), GCE (CG42739), IDGF4 (CG1780), FTZ-F1 (CG4059) e Kr-h1 (CG18783) foram identificados por meio de palavras-chave na base de dados *Flybase* ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)). Suas sequências proteicas, em formato *fasta*, foram recuperadas e serviram de entrada para buscas usando o algoritmo BLASTP contra a base de dados *Official Gene Set 3.2* (Elsik et al., 2007; disponível em [www.beebase.org](http://www.beebase.org)) e contra o banco não-redundante (nr) do *GenBank*. As sequências preditas (modelos gênicos) ou referências (validadas) de Cal (GB51551, XP\_392114.1), GCE (GB44365, XP\_395005.4), IDGF4 (GB52829, XP\_396769.2), FTZ-F1 (GB42142, XP\_001122182.2) e Kr-h1 (GB45427, NP\_001011566.1 e NP\_00129399.1) foram identificadas na versão 4.5 do genoma da abelha *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Essas foram manualmente anotadas usando ferramentas da plataforma Artemis 7.0 (Rutherford, et al. 2000) para compreensão da organização estrutural dos elementos genéticos. No caso dos genes codificadores de proteínas, a anotação possibilitou o desenho de oligonucleotídeos (*primers*) específicos que flanqueiam exons distintos (ver Tabela 2). A sequência de *primers* para let-7, bantam, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b e miR-281 (ver Tabela 2) é idêntica à sua sequência madura disponível no miRBase versão 20 ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), exceto nas posições contendo a base nitrogenada uracila as quais foram substituídas por timina. Os microRNAs também foram anotados no genoma.

#### 3.2 Material biológico

No presente estudo foram utilizadas operárias da abelha africanizada *A. mellifera*, mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Para coleta das amostras, utilizamos os critérios estabelecidos por Michelette e Soares (1993), com modificações apresentadas na Tabela 1. Em particular, consideramos como “mudas”, as amostras cujo peso encontrava intermediário a duas fases, conforme indicado abaixo.

Cada indivíduo teve seu peso aferido e, em seguida, a região anterior (cabeça) foi descartada com auxílio de tesoura e estereomicroscópio. Cinco *pools* independentes para cada fase, foram montados separadamente, em 500µL de reagente TRIzol® (Invitrogen), estocadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total. **Vale ressaltar que a retirada da cabeça foi um critério estabelecido para este trabalho, dado que a proliferação e diferenciação das células do sistema nervoso ocorrem, principalmente,**

durante a fase larval (Fahrbach, 2006; Moda et al., 2013). Assumimos, assim, que a neurogênese é um processo muito particular do desenvolvimento devendo apresentar padrões específicos de expressão gênica, os quais poderiam perturbar os resultados e as interpretações que buscamos. Além disso, nosso intuito é acessar cascatas gênicas *downstream* (sinalização secundária) acionadas pelos fatores do eixo neuroendócrino.

**Tabela 1:** Critérios utilizados para classificar as fases do desenvolvimento larval e pupal de operárias de abelhas *Apis mellifera* (modificado de Michelette e Soares, 1993).

| <b>Fases</b> | <b>Características</b>                       |
|--------------|--|
| muda L3-L4   | 3,1 – 4,9 mg                                 |
| L4           | 5,0 – 24,8 mg                                |
| muda L4-L5   | 24,9 – 29,0 mg                               |
| L5F1         | 29,1 – 60,0 mg                               |
| L5F2         | 60,1 – 110,0 mg                              |
| L5F3         | 110,1 – 160,0 mg                             |
| L5S3         | Célula operculada, larva com intestino vazio |
| PP1          | Comprimento tíbia-tarso = 1,4 a 1,99 mm      |
| PP3          | Comprimento tíbia-tarso > 2,6 mm             |
| Pw           | Pupa de olho branco                          |

### 3.3 Tratamentos hormonais

Para os tratamentos hormonais, operárias no quinto estágio larval (L5S3) foram retiradas de favos de cria e mantidas em estufa a 34°C e 80% umidade relativa. Após 16 horas (correspondente ao 2º estágio de pupa farata, PP2) essas abelhas receberam os tratamentos hormonais, conforme descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

#### 3.3.1 Tratamento com 20-hidroxicdisona (20E)

Para testar possíveis efeitos de 20E na expressão dos genes codificadores de Cal, GCE e IDGF4, este hormônio (Sigma) foi inicialmente diluído em etanol (MERCK) e a solução foi estocada na concentração de 20 µg/µL. Em seguida, a solução foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%), obtendo-se uma solução de trabalho na concentração de 5 µg/µL. Um total de 25 pupas faratas (PP2) receberam injeção de 1 µL desta solução na região ventro-posterior. Como grupos controle, 23 PP2 foram injetadas com 1 µL de salina, enquanto 23 PP2 não receberam nenhum tratamento. As soluções foram cuidadosamente injetadas com auxílio de microinjetor. As abelhas foram mantidas em estufa a 34°C e 80%

umidade relativa. Entre 5 e 6 indivíduos de cada grupo experimental (Controle sem tratamento, 20E, salina) foram coletados 6 e 24 horas após os tratamentos. As amostras foram homogeneizadas em 500 µL de reagente TRIzol® (Invitrogen), estocadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total. Os demais indivíduos foram mantidos em estufa para observação do desenvolvimento.

### **3.3.2 Tratamento com Hormônio Juvenil (HJ III)**

Para testar possíveis efeitos de HJ na expressão dos genes codificadores de Cal, GCE e IDGF4, o hormônio juvenil tipo III (Sigma) foi inicialmente diluído em acetona (MERCK) ou em hexano (Synth), e ambas as soluções estocadas na concentração de 20 µg/µL. Para soluções de trabalho, os estoques foram novamente diluídos em acetona (o grupo que recebeu esse tratamento será chamado de HJ+acetona) ou em hexano (o grupo que recebeu esse tratamento será chamado de HJ+hexano) para a concentração de 5 µg/µL. Um total de 2 µL dessas soluções (10 µg/µL) foram aplicadas topicamente em 20 pupas faratas PP2. Como grupos controle, 20 PP2 foram tratados com 2 µL de acetona, 20 larvas PP2 com 2 µL de hexano, enquanto 20 PP2 não receberam nenhum tratamento. As soluções foram cuidadosamente aplicadas com auxílio de um micropipetador de 0,5-2 µL. Após os tratamentos, as abelhas foram mantidas em estufa a 34°C e 80% umidade relativa. Seis indivíduos de cada grupo experimental (Controle sem tratamento, HJ+acetona, acetona, HJ+hexano, hexano) foram coletados 6 e 24 horas após os tratamentos. As amostras foram homogeneizadas em 500 µL de reagente TRIzol® (Invitrogen), estocadas em freezer -80°C até o momento da extração do RNA total. Os demais indivíduos foram mantidos em estufa para observação do desenvolvimento.

### **3.4 Extração de RNA total**

As amostras (em tubos contendo TRIzol®) foram homogeneizadas com o auxílio de ponteiros plásticas. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente para lise de membranas e dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram centrifugados a 12.000 x g, a 4°C, por 10 minutos para separação das carcaças. Os sobrenadantes de TRIzol® foram transferidos para tubos de 2 mL, adicionando-se 100 µL de clorofórmio. Após agitação manual por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos, as soluções foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C, por 15 minutos. Para retirar excessos de gordura, repetiu-se a etapa de adição de clorofórmio. Os sobrenadantes (fase transparente, aproximadamente 400 µL) foram transferidos para tubos de 1,5 mL acrescidos de 250 µL de isopropanol. Após 10 segundos em aparelho agitador de tubos (vortex), incubação das amostras por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 x g a 4°C, por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados. Os produtos

precipitados (*pellets*) foram lavados com 500 µL de etanol 75% mediante agitação em vortex e novamente centrifugados a 7.500 x g a 4°C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os tubos colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a 55°C, por 5 minutos, para evaporação de etanol residual. Para evitar degradação por RNases, os *pellets* foram ressuspensos em 70 µL de água DEPC 0,1%. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/ µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorvância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies).

### **3.5 Síntese de cDNA**

#### **3.5.1 cDNA para genes codificadores de proteínas**

Volumes de RNA total, com massas correspondentes a 3 µg, foram completados com água DEPC 0,1% para 9 mL. Adicionou-se 0,5 µL 10x DNase I *Reaction Buffer* (Invitrogen) e 0,5 µL de DNase I (Invitrogen) para remoção de possível contaminação por resíduos de DNA, a 15 minutos na temperatura ambiente. Adicionou-se 1 µL de 25mM EDTA incubando-se em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 65°C, por 10 minutos para inativação da enzima. O RNA total tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, em volume final de 20 µL, utilizando-se, por amostra, o seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 ng/mL), 1 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 minutos; 4 µL de tampão *5x First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µL de ditriotretol 0,1 M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de RNase (*RNase OUT™*, 40 U/ µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 minutos; 0,5 µL de água DEPC 0,1% e 0,5 µL da enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 U/mL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Como controle negativo, foram preparadas reações sem a enzima *SuperScript™ II*.

#### **3.5.2 cDNA para microRNAs**

A síntese de cDNA para microRNAs foi realizada usando o *kit NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR* (Invitrogen) e seguindo suas instruções. Em suma, 3 µg de RNA total (fases de L3-L4 a Pw) foram primeiramente poli-adenilados conforme se segue: os volumes contendo o RNA total foram completados com água DEPC 0,1% para 12,5 µL. Adicionou-se 2,5 µL de *5x miRNA Reaction Buffer*, 1,25 µL de 25mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de ATP 10mM diluído 1:50 em Tris 1 mM (pH 8.0) e 0,25 µL de *Poly A Polimerase*. As reações foram incubadas em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 37°C, por 15 minutos. Em seguida, 4 µL do RNA poli-adenilado foram

transferidos para novos tubos, adicionando-se 1 µL de *Annealing Buffer* e 3 µL de Universal RT Primer. Estas reações foram incubadas em termociclador a 65°C por 5 minutos e depois colocados no gelo por 1 minuto. Por fim, adicionou-se 10 µL de 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNase OUT<sup>TM</sup>* (Invitrogen), incubando-se a 50°C por 50 minutos seguido de 85°C por 5 minutos. Como controle negativo, foram preparadas reações sem a enzima *SuperScript III/RNase OUT<sup>TM</sup>*.

### **3.6 Análise de expressão gênica**

A análise de expressão de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1 e Kr-h1 foi realizada por meio de RT-qPCR. O gene codificador de rp49 (número de acesso no *GenBank*: AF441189), cuja expressão é constitutiva ao longo do desenvolvimento (ver Lourenço et al., 2008), foi utilizado como normalizador das reações de PCR. Para normalizar a expressão dos microRNAs, usou-se o U5 snRNA, um componente da maquinaria de 'spliceossomo', e indicado na literatura como tendo expressão constitutiva (Schmittgen et al., 2004). A lista de *primers* utilizados encontra-se na Tabela 2.

Para amplificação por qPCR foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR® Green* (Applied Biosystems). A reação final consistiu em: 10 µL de solução *SYBR® Green* (Applied Biosystems), 6,4 µL de água deionizada e autoclavada, 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de cDNA (diluição 1:10). As reações foram montadas em triplicatas e processadas em aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto). O ciclo de dissociação para todos os *primers* foi 95°C a 60°C (15 segundos em cada grau), 60°C (1 minuto), 60°C a 95°C (15 segundos em cada grau). A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por análise da curva de dissociação para cada amostra. Foram observados picos únicos, que indicaram reações específicas.

Os dados foram transferidos para planilhas eletrônicas do *Microsoft Excel* (*Microsoft Windows*), no qual foram feitos gráficos. O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001) foi utilizado para as análises de expressão relativa.



**Tabela 2:** Informações sobre os *primers* desenhados para esse estudo.

| <i>Locus</i>    | Código do <i>primer</i> | Sequência 5' -> 3'   | Tamanho do fragmento amplificado |
|-----------------|-------------------------|--|----------------------------------|
| rp49            | rp49-F                  | CGTCATATGTTGCCAACTGGT  | 150 pb                           |
|                 | rp49-R                  | TTGAGCACGTTCAACAATGG   |                                  |
| U5 snRNA        | U5-F                    | CTCTGGTTTCCCTTCAAATC   | 74 pb                            |
|                 | U5-R                    | ATCAATTGTTCCCCTCCACG   |                                  |
| <i>Calponin</i> | Cal-F                   | GACAAAATCTCAATTCAGTC   | 151 pb                           |
|                 | Cal-R                   | CTAATTACACCCTGTCCAGC   |                                  |
| IDGF4           | IDGF-F                  | ACGGTTTCACCATCCTGGTC   | 134 pb                           |
|                 | IDGF-R                  | GATATTGGGCGCCAACAATC   |                                  |
| GCE             | GCE-F                   | GGAGAACCCATTTATCTACG   | 189 pb                           |
|                 | GCE-R                   | TTGTATTATGGCTCTCATGG   |                                  |
| FTZ-F1          | FTZ-F                   | GACTGGGCAAGGAATTCTGT   | 152 pb                           |
|                 | FTZ-R                   | CCATTATGAAGCGTAGTCTCA  |                                  |
| Kr-h1           | Kr-h1-F                 | GCACTGGCAGTGACAAGGAA   | 75 pb                            |
|                 | Kr-h1-R                 | GTGGAGTGTTCGTAAGTAGCAA   |                                  |
| let-7           | let-7-F                 | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT  | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| bantam          | bantam-F                | TGAGATCATTGTGAAAGCTGATT  | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| miR-8           | miR-8-F                 | TAATACTGTCAGGTAAAGATGTC  | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| miR-100         | miR-100-F               | AACCCGTAGATCCGAACTTGTG   | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| miR-125         | miR-125-F               | CCCCTGAGACCCTAACTTGTGA   | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| miR-252a        | miR-252a-F              | ATAAGTACTAGTGCCGCAGGAG   | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| miR-252b        | miR-252b-F              | TTAAGTAGTAGTGTCGTAGATGA  | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |
| miR-281         | miR-281-F               | TGTCATGGAGTTGCTCTCTTTGT  | ~ 45 pb*                         |
|                 | Reverse                 | * primer universal fornecido no kit NCode, com sequência não informada |                                  |

### **3.7 Validação de *primers***

A eficiência das reações utilizando os *primers* para amplificação dos fragmentos de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1, Kr-h1 e dos microRNAs let-7, bantam, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b, miR-281 foi analisada em reações de qPCR utilizando-se diluição seriada 1:10 de cDNA e construção de curvas de regressão linear específicas para cada *primer*. O valor *Slope*, fornecido pela curva, foi utilizado para avaliar a eficiência da reação (E) utilizando-se a fórmula  $E=10^{(-1/Slope)}$ . O fator de correlação linear ( $R^2$ ) entre as concentrações do produto amplificado e os valores de seus ciclos limítrofes (*threshold cycle* –  $C_T$ ) indica-se que valor seja o mais próximo de 1.  $C_T$  são pontos de cinética da reação que representam, em valores, a quantidade de ciclos de amplificação necessários para detecção da expressão de um gene.

### **3.8 Análise estatística**

Nos experimentos com tratamentos hormonais, as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa StatPlus@:mac2009 (AnalystSoft). Os dados de expressão gênica foram avaliados por teste ANOVA um critério, seguido do Tukey-HSD, considerando  $p<0,05$ .

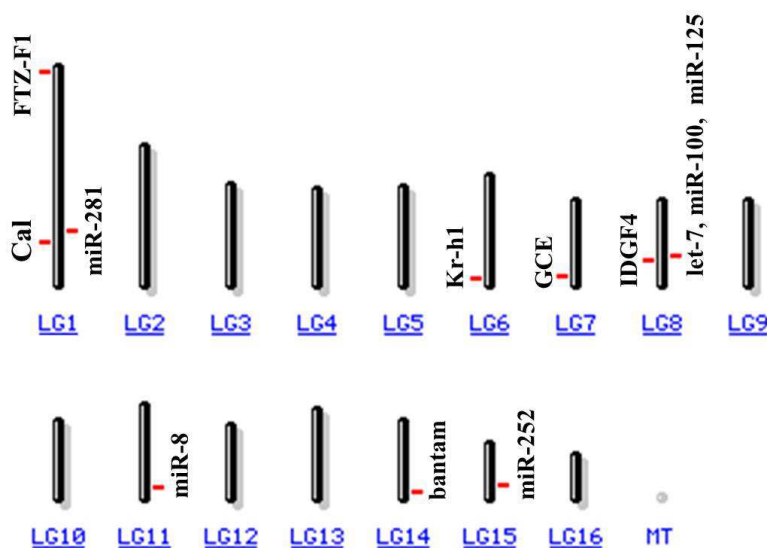
## ***4. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

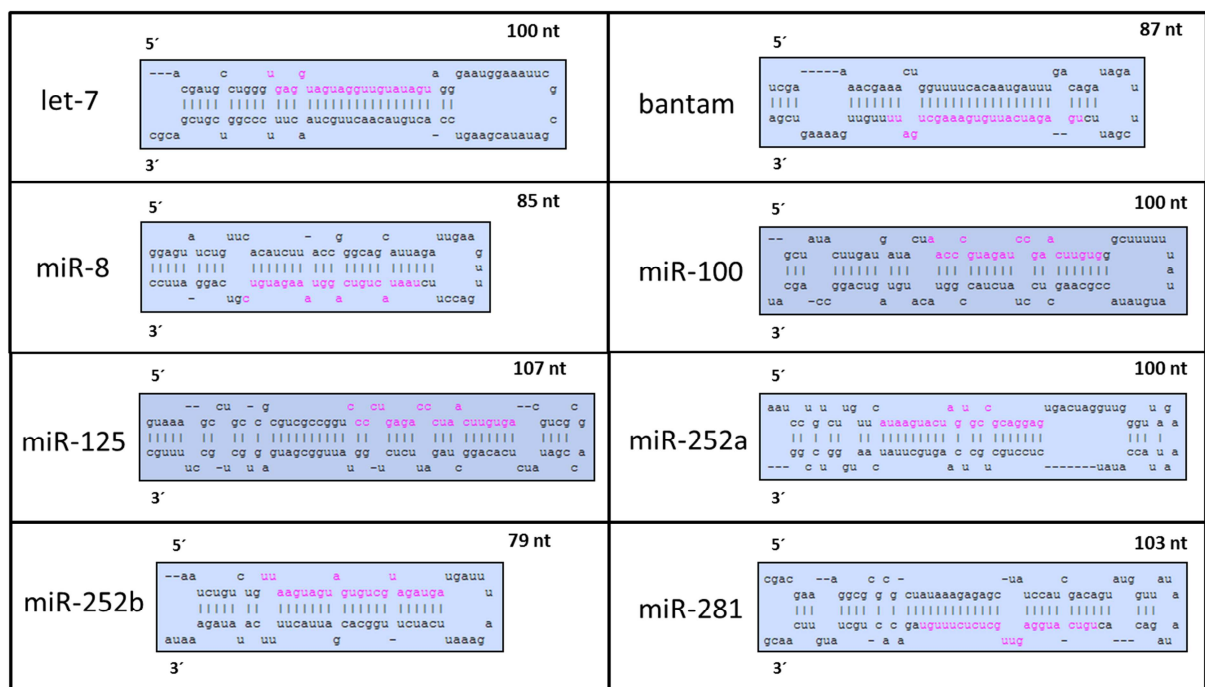
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação genômica e caracterização estrutural dos genes codificadores de proteína e microRNAs

Todos os elementos genéticos desse estudo foram identificados no genoma de *A. mellifera*, versão 4.5 (Figura 4). Os microRNAs miR-100, let-7 e miR-125 estão localizados em *tandem* no cromossomo 8, formando o *cluster* let-7 previamente descrito por Behura (2007). Este *cluster* está a uma distância de aproximadamente 1,3kb do gene IDGF4. Os genes codificadores de Cal, FTZ-F1 e o miR-281 estão localizados no cromossomo 1, Kr-h1 no cromossomo 6, GCE no cromossomo 7, miR-8 no cromossomo 11, bantam no cromossomo 14 e miR-252 no cromossomo 15. Conforme mostrado na Figura 5, a sequência primária dos microRNAs estudados variam de 79 a 107 nucleotídeos (nt), e as sequências maduras encontrando-se tanto no braço 5' (5p) quanto no braço 3' (3p).



**Figura 4:** Localização cromossômica dos genes codificadores de Cal, GCE, IDGF4, Kr-h1 e FTZ-F1 e dos microRNAs let-7, bantam, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252, miR-281 no genoma de *Apis mellifera* versão 4.5. A ilustração (modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=apis%20mellifera>) está baseada nos 16 cromossomos autossomos (LG, do inglês *linkage group*) dessa abelha, além do genoma mitocondrial (MT).



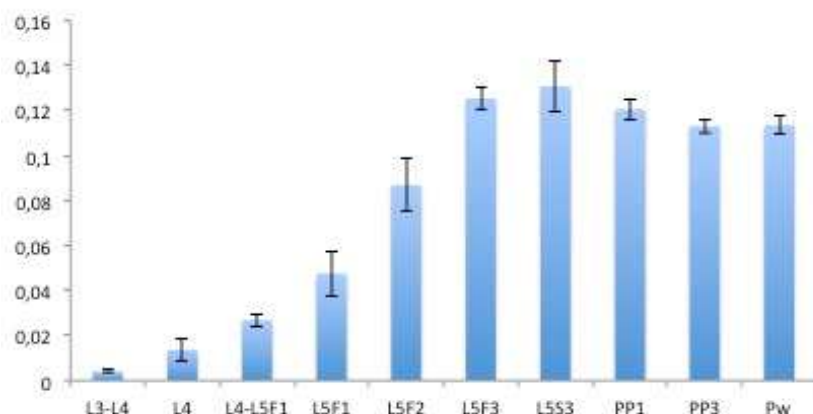
**Figura 5:** Estrutura secundária (*stem loop* ou *hairpin*) dos transcritos primários dos microRNAs let-7, bantam, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b, miR-281 de *Apis mellifera*. Os nucleotídeos correspondentes ao microRNA maduro estão marcados em lilás (fonte *miRBase* versão 20).

A Figura 6 ilustra a estrutura dos genes codificadores de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1 e Kr-h1. Os sinais canônicos GT/AG (segundo Breathnach e Chambon, 1981) foram encontrados em praticamente todos os sítios de *splicing* analisados. A exceção ocorreu no gene Kr-h1. Nossas análises nos indicaram que o melhor modelo do gene Kr-h1 é o do *GenBank* (NM\_001242470.1) localizado no grupo 6.37 da versão 4.5 do genoma. No entanto, existe ainda um conflito na montagem genômica relativo ao segundo intron e ao terceiro exon, os quais pertencem ao GroupUn404. Conseguimos definir a região codificadora, mas ainda restam dúvidas sobre o tamanho real do intron 2. O *primer* Kr-h1-F foi desenhado na fronteira entre os exons 2 e 3, validando nossa análise.



L5S3, momento em que as larvas já cessaram o período de alimentação e tecelagem do casulo. Na transição larva-pupa há uma ligeira perda de peso. O tamanho final dos indivíduos adultos é definido no último estágio larval, não havendo crescimento a partir da pupa farata (Nijhout, 2003). Nijhout et al. (2006) também defendem que o “peso crítico” pode ser avaliado como o peso em que a nutrição não é mais necessária, sinalizando assim a metamorfose.

Em larvas de insetos, o sinal para parar de crescer e iniciar uma muda é a secreção de ecdisteroides. Nijhout et al. (2006) estudaram a metamorfose de *Manduca sexta*, e descobriram que a muda larval é causada por pulsos de ecdisona. Além disso, no último estágio larval, elas param de se alimentar e iniciam a metamorfose. A secreção do hormônio é determinada pelo peso crítico, ou seja, momento no qual a larva atinge um limiar de tamanho que dispara uma série de eventos endócrinos, os quais ocasionam a parada da fase de alimentação e o início da metamorfose, o que também é coerente para *A. mellifera*.

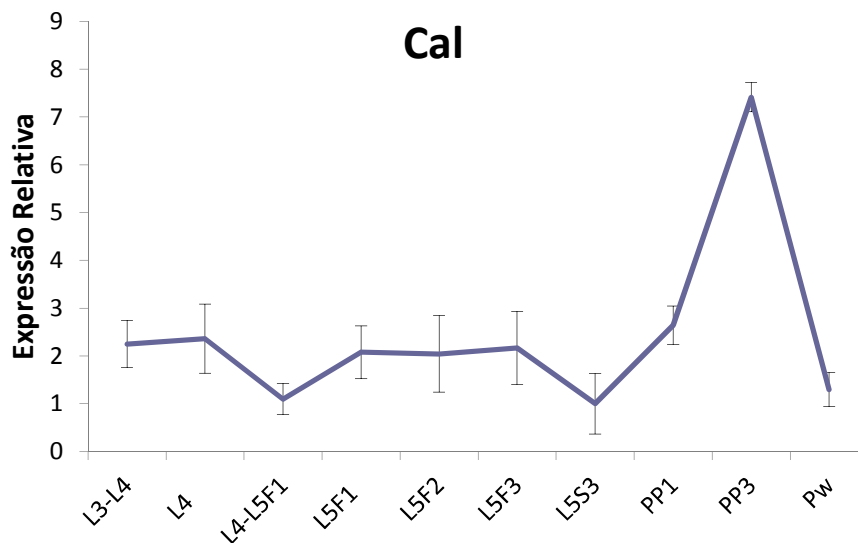


**Figura 7:** Progressão do ganho de peso (mg) ao longo do desenvolvimento pós-embrionário de operárias de *Apis mellifera*, desde estágio larval muda L3-L4 até pupa de olho branco (Pw). Foram mensuradas 5 indivíduos por estágio.

#### 4.3 Expressão gênica de genes codificadores de proteínas

Foram analisados os perfis de expressão dos genes codificadores de Cal, GCE, IDGF, FTZ-F1 e Kr-h1 durante parte dos estágios larvais (incluindo períodos de muda) e na transição larval-pupa (muda metamórfica) de operárias.

Com relação à expressão do gene Cal, observa-se níveis de transcritos relativamente mais elevados nas fases de alimentação do que nos estágios de muda larval, bem como um pico antes da pupação. O perfil de expressão são similares aos descritos durante o desenvolvimento do holometábolo *Helicoverpa armigera* (Liu et al., 2011).



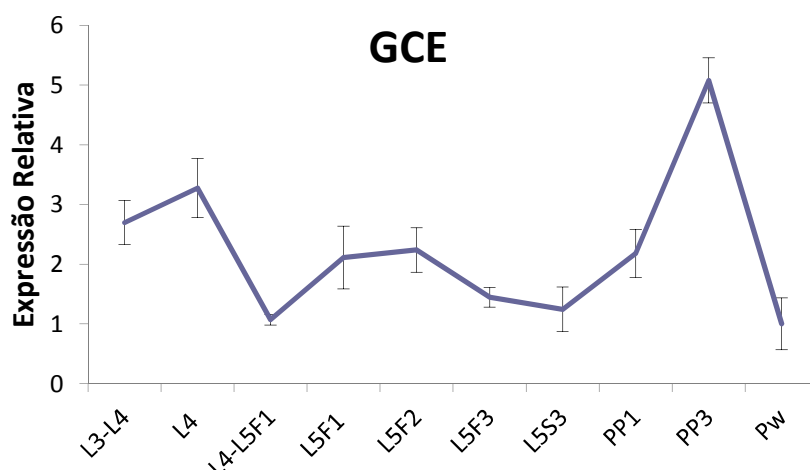
**Figura 8:** Valores de expressão por qPCR do gene Cal durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de rp49 foi utilizada como normalizador na expressão do gene Cal. As amostras com menor média de expressão (muda L4-L5F1) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Número de amostras por fase igual a 5.

Nossos dados de expressão do gene codificador de GCE foram semelhantes aos achados por Konopova et al. (2011) analisando o perfil de Met durante o desenvolvimento de *Pyrrhocoris apterus*. Esses pesquisadores demonstraram haver um perfil de expressão quase que constante ao longo do desenvolvimento larval e um pico de expressão que caracteriza a muda metamórfica, também identificado por nós.

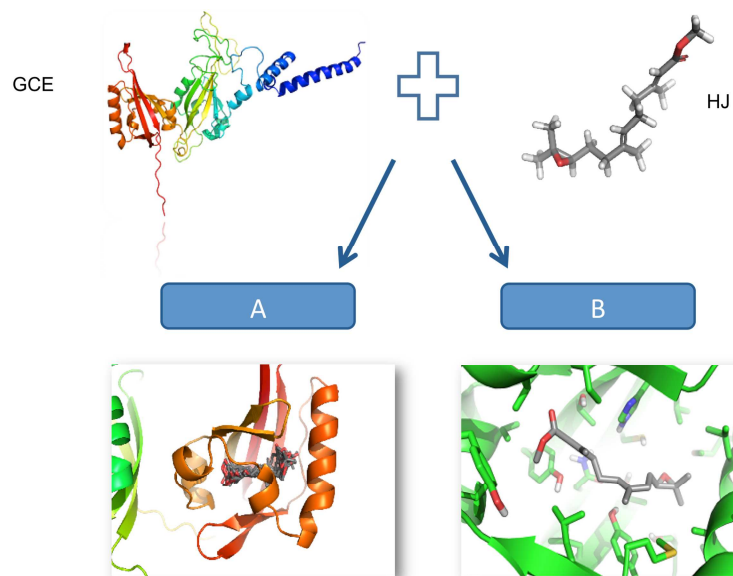
A supressão da expressão de Met em *T. castaneum* pela injeção de RNA de fita dupla (dsRNA) nos terceiro e quarto estágios larvais provoca metamorfose precoce (Konopova e Jindra, 2007). Os achados indicam um inegável papel da proteína Met (e de seu parálogo GCE) para a ação do HJ.

Em busca de evidências de associação entre GCE (receptor) e HJ (ligante) em abelhas, usamos técnicas de modelagem molecular (*protein-ligand docking*) para analisar uma possível interação desses atores (Figura 10).





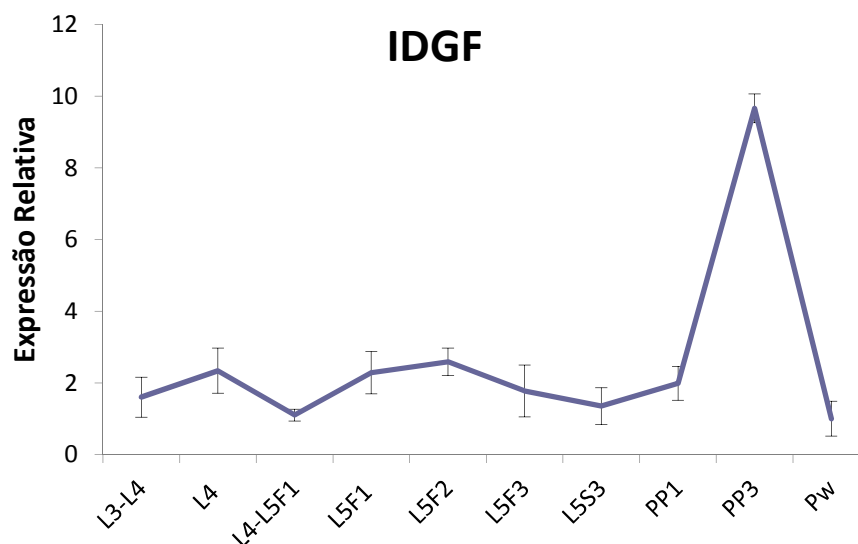
**Figura 9:** Valores de expressão por qPCR do gene GCE durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de rp49 foi utilizada como normalizador na expressão do gene GCE. As amostras com menor média de expressão (Pw) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Número de amostras por fase igual a 5.



**Figura 10:** Estruturas tridimensionais e interação molecular de GCE e HJ. Em A, observa-se a sobreposição das várias simulações tipo *docking* geradas, mostrando o encaixe de HJ em um dos sulcos de GCE, mas particularmente no domínio PAS C-terminal. Em B ampliamos a região de interação. As predições foram realizadas usando o programa HHPred docking (*Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison*, <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) em colaboração com os bioinformatas Leonardo Bortot (FCFRP-USP) e Dr. Rodrigo Faccioli (EESC-USP).

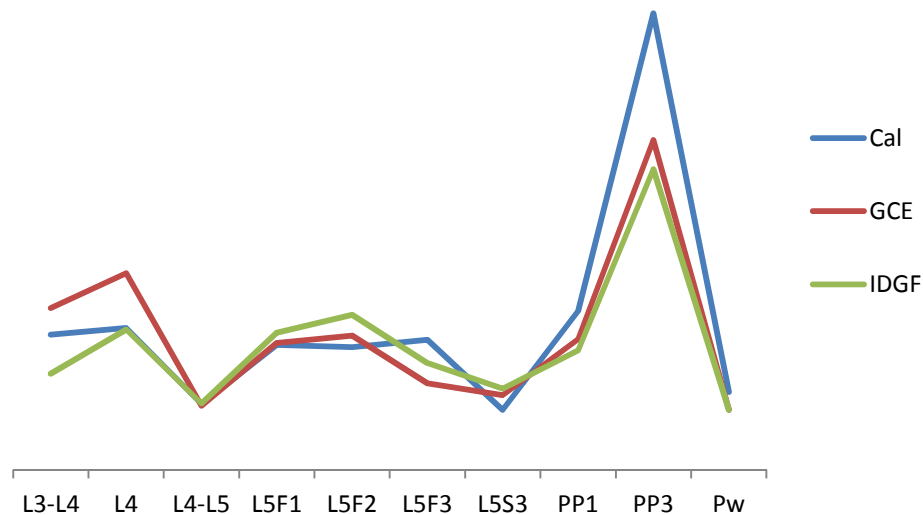
O gene codificador de IDGF (Figura 11) também apresentou um perfil de expressão muito semelhante aos outros genes investigados. Identificou-se um alto nível de expressão transcricional durante a fase final de alimentação (L5F) e também durante a pupa farata (PP). Em *B. mori*, Wang et al. (2009) observaram que IDGF é nutricionalmente regulado. Os autores detectaram uma alta expressão de IDGF no corpo gorduroso e hemolinfa, locais de síntese e de dispersão desses fatores de crescimento para outros tecidos, respectivamente. Em animais submetidos à restrição calórica (*starvation*), houve uma queda da expressão de mRNAs de IDGF no corpo gorduroso e de proteínas IDGF na hemolinfa. Em seguida, os pesquisadores notaram um resgate da expressão de IDGF quando a alimentação dos insetos foi restabelecida. Esses resultados são compatíveis com nossos dados em abelhas.

Em *A. mellifera*, Nunes et al. (2004a) identificaram uma EST (*expressed sequence tag*) correspondente a um ortólogo de IDGF4 em amostras de larvas (número de acesso GenBank CK631593.1). Em experimentos subsequentes, usando RT-PCR semi-quantitativa, Nunes et al. (2004b) identificaram dois picos de expressão de transcritos de IDGF ao longo do desenvolvimento de larvas de operárias, na fase de alimentação (L5F) e outro em pupa farata (PP). Nossos dados de expressão de IDGF4 refinam o padrão encontrado por Nunes et al. (2004b), com picos de expressão detectados foram nas fases de alimentação L5F2 e em pupa farata (PP3).



**Figura 11:** Valores de expressão por qPCR do gene IDGF durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de rp49 foi utilizada como normalizador na expressão do gene IDGF. As amostras com menor média de expressão (Pw) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Número de amostras por fase igual a 5.

Os resultados dos perfis de expressão de Cal, GCE e IDGF4 são muito similares, o que sugere que sejam co-regulados. Análises preliminares de bioinformática indicam a existência de elementos cis-reguladores em comum na região promotora *upstream* desses genes (dados não mostrados), que potencialmente recrutam os mesmos fatores de transcrição. A fim de tornar mais clara a visualização de tais similaridades, elaboramos um gráfico sobrepondo os resultados (Figura 12).



**Figura 12:** Análise comparativa da expressão dos genes codificadores de Cal, GCE e IDGF4 no desenvolvimento pós-embrionário.

Observamos níveis mais basais dos transcritos desses genes em L4-L5F1 (correspondente ao um período de transição larva-larva) e na fase L5S3 (fase final de tecelagem de casulo), e portanto, indicam: (i) uma potencial regulação nutricional, (ii) um envolvimento no processo de ecdise e (iii) sinais para o comprometimento (*commitment*) metamórfico, um processo irreversível (Riddiford,1993). Curiosamente, alguns dos picos observados coincidem com momentos em que os níveis de HJ começam a diminuir (L5F2) ou quando estão basais (PP3), sugerindo um *crosstalk* gene-hormonal. A sinalização para que haja a muda larval ou ecdise depende da prévia ocorrência de um pico de ecdisteroides e da parada da alimentação (Zitnan e Adams, 2005). Existe um pico de ecdisteroides no final de L4 e que induz a muda L4-L5F1. Ainda que não exista uma muda entre L5F e L5S, hipotetiza-se a existência um pico de ecdisteroides ao final da fase L5F, de menor intensidade que o de PP2 (Dr. Moisés Elias-Neto, comunicação pessoal). Tal pico não é descrito em abelhas, porém é bem caracterizado em Lepidoptera, sendo responsável por inibir o comportamento de alimentação e sinalizar o comprometimento do inseto com a metamorfose (Nijhout, 1994). Os dados de peso apresentados na Figura 7 também favorecem tal hipótese. Como sabemos, a partir da fase L5S as abelhas em

desenvolvimento não mais se alimentam até a emergência dos adultos. Juntos, nossos dados indicam que em fases em que as larvas estão comendo, como em L4 e L5F (F1, F2 e F3), a dieta e/ou os processos neuro-mecano-químicos ligados à alimentação (Boleli et al., 1998) induzem de forma sutil, porém positiva, a expressão desses genes. O pico de expressão desses genes foi observado em PP3, momento em que as larvas não mais se alimentam, seguido de queda em Pw. Sugerimos, que estes genes são importantes sinais moleculares (ou ao menos marcadores) para a ocorrência da muda metamórfica. Em abelhas, há relatos de outros genes com o mesmo comportamento na transição larva-pupa, tanto do ponto de vista transcricional (gene *AmelCPR14* - Soares et al., 2007) quanto proteômico (Wolstedji et al., 2013).

Temos, assim, dois padrões de expressão que parecem governados por programas genéticos distintos, um nutriente-responsivo (ou dieta-dependente) e outro metamórfico-responsivo (ou dieta-independente). Acreditamos que esses padrões ocorrem pelo menos nos holometábolos, pois perfis muito semelhantes foram descritos por Liu et al. (2011) em *Helicoverpa armigera*.

O gene codificador de FTZ-F1 (Figura 13) não apresentou grandes flutuações de expressão ao longo do desenvolvimento. Entretanto, assim como os genes codificadores de Cal, GCE e IDGF4, apresentou um pico durante a fase de pupa farata (PP3), seguida de muda queda abrupta em Pw.

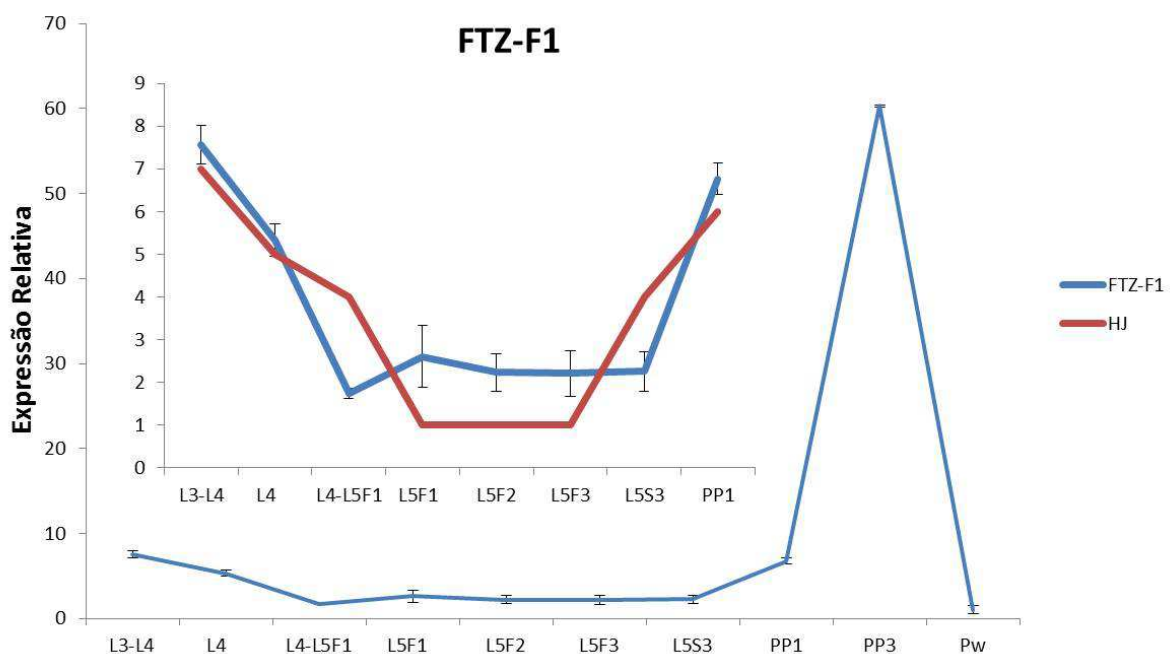
Muitos estudos vêm tentando elucidar o processo de ação de 20E sobre a metamorfose, porém a resposta diferencial dos tecidos ao mesmo pulso de ecdisteroides ou, ainda, como um mesmo tecido responde de maneira distinta a vários pulsos de ecdisteroides durante o desenvolvimento são questões que não estão completamente esclarecidas (revisado por Yamanaka et al., 2013). Mesmos os dados sobre o receptor de ecdisona (EcR) são insuficientes para explicar toda a complexidade e dinâmica da metamorfose.

O receptor nuclear, FTZ-F1, expresso durante metamorfose de *D. melanogaster*, atua como um fator de transcrição específico para regular genes em estágios onde ocorrem picos de ecdisteroides. Estudos com *Aedes aegypti* constataram que FTZ-F1 associa-se com o complexo histona-acetiltransferase p160/SRC (chamado Taiman em *D. melanogaster* e FISC em *A. aegypti*) ligando-o ao complexo EcR/USP. FTZ-F1 também promove a ligação desse complexo formado (EcR / USP / FISC) aos promotores-alvos (Zhu et al., 2006).

Até o momento, a literatura indica que o FTZ-F1 (i) pode potencializar o efeito de ecdisona por interação com cofatores de EcR (revisado por Yamanaka et al., 2013), (ii) é um fator de competência para HJ, uma vez que é requerido para ativação de genes de resposta primária a este hormônio (Dubrovsky et al., 2011). Tudo leva a crer que o FTZ-F1

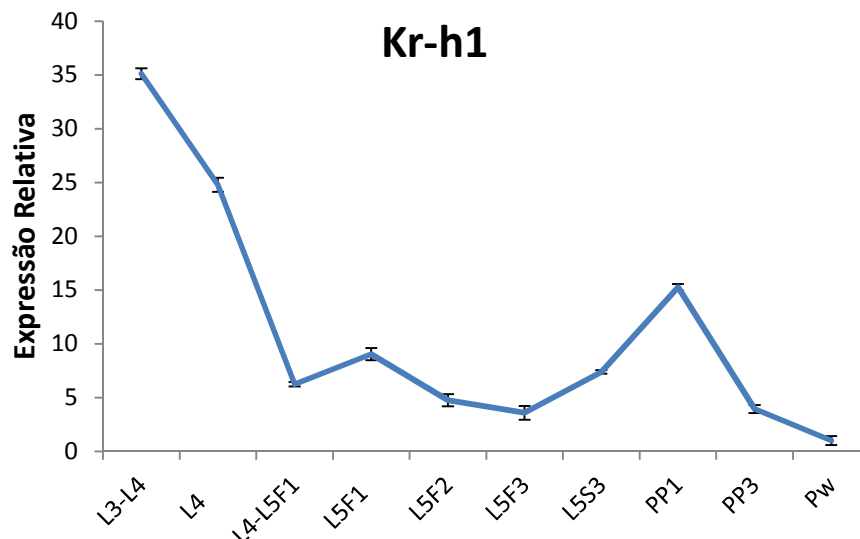
sinaliza para ecdisteroides e HJ, por meio do recrutamento de p160/SRC aos seus receptores. O complexo p160/SRC por sua vez, dimeriza com o Met (revisado por Yamanaka et al., 2013)

Embora FTZ-F1 exiba distribuição tecidual generalizada, o seu perfil no desenvolvimento é bastante restrito em *D. melanogaster*, apresentando maior expressão (porém transitória) após o pico de 20E, seja antes de cada ecdise larval ou antes da muda metamórfica (Yamada et al., 2000). Em nosso trabalho, observamos uma elevada expressão de mRNAs de FTZ-F1 na fase de PP3 (que antecede a muda metamórfica), quando HJ e 20E são basais. Além disso, observamos que da muda L3-L4 até PP1 abundância de transcritos de FTZ-F1 segue o mesmo perfil da curva de HJ. Nossa hipótese é que a expressão deste gene direciona respostas tempo- e espaço-específicas, mediadas pela ação hormonal (tanto de 20E quanto de HJ) e ligando-se a diferentes cofatores em cada período ou tecido ao longo do desenvolvimento, regulando o crescimento e a metamorfose, como em *D. melanogaster* (Woodard et al., 1994; Broadus et al., 1999; Yamada et al., 2000).



**Figura 13:** Valores de expressão por qPCR do gene FTZ-F1 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de rp49 foi utilizada como normalizador na expressão do gene FTZ-F1. As amostras com menor média de expressão (Pw) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Número de amostras por fase igual a 5. Inseto: corresponde aos mesmos dados visualizados em escala distinta. . A curva de hormônio juvenil (HJ) não está em escala, porém representa seu perfil no desenvolvimento de operárias.

Níveis elevados de transcrição do gene codificador de Kr-h1 (Figura 14) foram detectados durante as primeiras fases do desenvolvimento (muda L3-L4 e L4) e durante a primeira fase de pupa farata (PP1). Seus menores níveis de expressão foram detectados durante as fases de alimentação (L5F), tecelagem de casulo (L5S3), pupa farata (PP3) e pupa de olho branco (Pw). Assim como para FTZ-F1, o perfil de expressão de Kr-h1 se assemelha em parte aos títulos de HJ circulantes na hemolinfa.



**Figura 14:** Valores de expressão por qPCR do gene Kr-h1 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de rp49 foi utilizada como normalizador na expressão do gene Kr-h1. As amostras com menor média de expressão (Pw) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Número de amostras por fase igual a 5.

O perfil de expressão de Kr-h1 que encontramos foi similar ao descrito no desenvolvimento dos hemimetábolos *P. apterus* (Konopova et al., 2011) e *B. germanica* (Lozano e Bellés, 2011), um indicativo da conservação de sequência e também na função de impedir a metamorfose precoce. Durante o final da embriogênese até o penúltimo estágio do desenvolvimento (N4) os níveis de Kr-h1 permanecem altos nos dois hemimetábolos, ocorrendo uma queda brusca após a ecdise para o último estágio de ninfa. Depois, a expressão de Kr-h1 permanece indetectável até a muda imaginal (ninfa-adulto). Os picos de expressão Kr-h1 coincidem com os títulos de HJ, confirmando que a transcrição de Kr-h1 requer a indução por HJ.

Os níveis de mRNA de Kr-h1 reduzem drasticamente em larvas L4 submetidas ao silenciamento de Met, demonstrando que em *P. apterus* (Konopova et al., 2011) e em *T. castaneum* (Parthasarathy et al., 2008; Minakuchi et al., 2009) trata-se de um gene alvo e

dependente de Met. E assim como o silenciamento de Met, o silenciamento de Kr-h1 também causa metamorfose precoce. Dessa forma, Konopova et al. (2011) sugere que a função de Met é responder ao HJ, mantendo alta a expressão de Kr-h1, impedindo a metamorfose precoce.

Em *T. castaneum*, ocorre uma redução temporária da expressão de Kr-h1 próximo ao último estágio larval, o que permite a ocorrência da muda metamórfica. Posteriormente a esse evento, Kr-h1 é totalmente inativo na pupa (Minakuchi et al., 2009). Como demonstrado na Figura 13, também observamos uma redução da expressão de Kr-h1 antes da muda metamórfica (PP3). Dessa forma, a diminuição da expressão de Kr-h1 na fase final de pupa farata, provavelmente, resulta da queda natural dos títulos de HJ na hemolinfa, o que é essencial para a transição larva-pupa.

#### **4.4 Expressão de microRNAs**

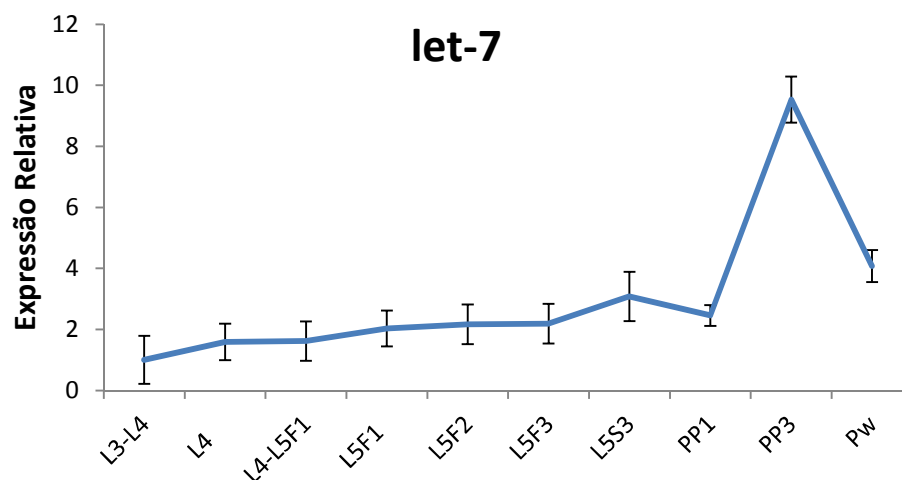
Além de avaliar a expressão dos mRNAs nas diversas condições experimentais, também investigamos a abundância de transcritos dos microRNAs: let-7, bantam, miR-8, miR-100, miR-125, miR-252a, miR-252b e miR-281, mas somente sob condições naturais. Os dados mostrados a seguir representam as médias de expressão para cada um dos microRNAs avaliados.

O perfil de expressão de let-7 apresenta um aumento progressivo desde a muda L3-L4 até a fase L5F2. Sua ligeira queda em L5F3 parece marcar o fim do período de alimentação. Seus níveis de transcrição voltam a subir durante a tecelagem do casulo (L5S3), caindo novamente em PP1, sinalizando o início da fase pre-pupal. O let-7 também apresenta o pico de expressão em PP3 e queda em Pw, como já observado para muitos dos genes codificadores de proteínas que estudamos (Figura 15). Esse resultado é coerente com o papel de let-7, classicamente encontrado na literatura, como regulador temporal (*timing*) do desenvolvimento e da metamorfose (Caygill e Johnston, 2008; Frasch, 2008).

Em *C. elegans*, o microRNA let-7 é induzido na última fase larval, promovendo a transição de larva para adulto (Reinhart et al., 2000). Em *D. melanogaster*, a expressão de let-7 ocorre ao final do terceiro estágio larval, em sincronia com os pulsos de 20E e a expressão de EcR e de outros genes responsivos a 20E (Sempere et al., 2002; Bashirullah et al., 2003; Tennessen e Thummel, 2008). Vale ressaltar que não apenas os ecdisteroides estão associados à ativação e manutenção da alta expressão de let-7. Sempere et al. (2003) provaram que a aplicação de metopreno (análogo do HJ) em cultura de células S2 inibe a transcrição de let-7, resultado muito coerente com o cenário metamórfico.

Em indivíduos de *B. mori*, a expressão let-7 começa a partir do terceiro estágio larval e desse momento em diante sua expressão aumenta gradualmente. Ou seja, a expressão

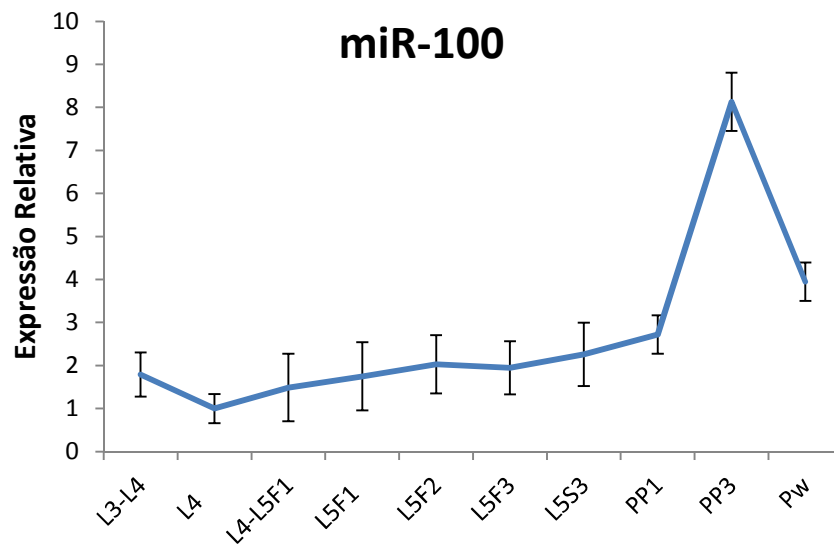
no início de cada muda é maior do que na muda anterior, apresentando uma maior abundância de transcritos durante a muda metamórfica. Além disso, nesse organismo, os níveis de expressão são maiores ao final de cada estágio larval e início de uma nova muda, coincidindo com os pulsos de 20E que ocorrem nesse momento (Liu et al., 2007). Dessa forma, em concordância com os dados encontrados em outros organismos, acreditamos que a interação de *let-7* com os ecdisteroides seja importante para a ocorrência das mudas larvais em *A. mellifera*, bem como seu pico de expressão durante a muda metamórfica sugere um papel regulador para a transição PP3-Pw.



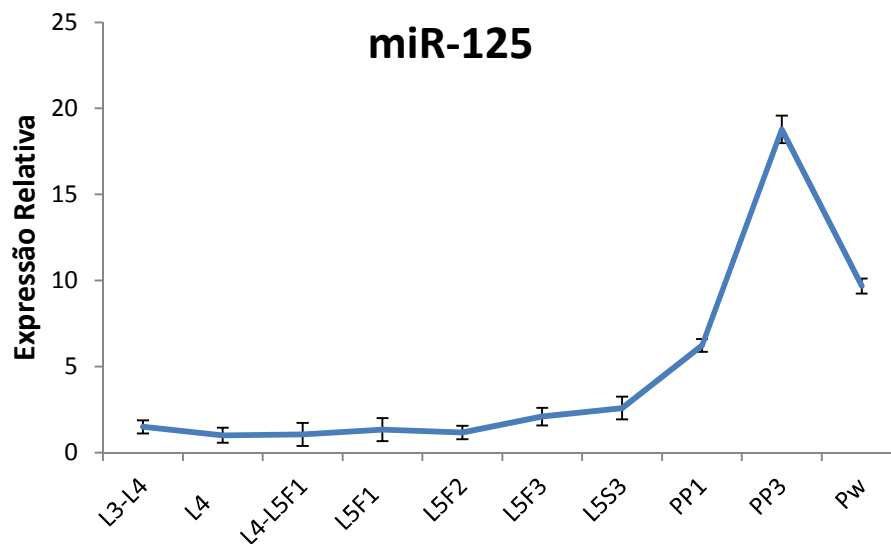
**Figura 15:** Expressão relativa do microRNA *let-7* durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do *let-7*. As amostras com menor média de expressão (muda L3-L4) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa.

A distribuição *in tandem* dos microRNAs *let-7*, miR-100 e miR-125 sugere que esse *cluster* (*cluster let-7*) seja expresso num único RNA policistrônico (Behura, 2007). No entanto, em *A. mellifera*, os perfis que encontramos para o miR-100 e o miR-125 são similares, sugerindo co-expressão, mas se diferem de *let-7*, indicando que esse último seja regulado de forma independente. As expressões de miR-100 (Figura 16) e de miR-125 (Figura 17) aumentam progressivamente no desenvolvimento larval, com pico em PP3 (fase que antecede a muda metamórfica) e queda abrupta em pupa (Pw).





**Figura 16:** Expressão relativa do miR-100 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-100. As amostras com menor média de expressão (L4) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa.



**Figura 17:** Expressão relativa do miR-125 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-125. As amostras com menor média de expressão (L4) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa.

Uma co-expressão/co-regulação de todo o *cluster* let-7 (let-7, miR-100, miR-125) é coerente durante a muda metamórfica (PP3), um padrão também observado em vários tecidos ou estágios do desenvolvimento de *D. melanogaster* (Pasquinelli et al., 2000; Sempere et al., 2002; Bashirullah et al., 2003; Sempere et al., 2003) e de *B. mori* (Liu et al., 2007; Jagadeeswaran et al., 2010). Além disso, a expressão destes microRNAs parece restrita à fase de transição larva-pupa em *D. melanogaster* (Caygill e Johnston, 2008) e, em *B. mori*, ocorre uma diminuição da expressão desses microRNAs durante a fase de pupa, o que pode explicar a queda desses microRNAs após a muda metamórfica (Pw) encontrado em nosso estudo. Esses microRNAs são elementos reguladores filogeneticamente conservados, necessários para a transição da forma juvenil para a adulta (Caygill e Johnston, 2008).

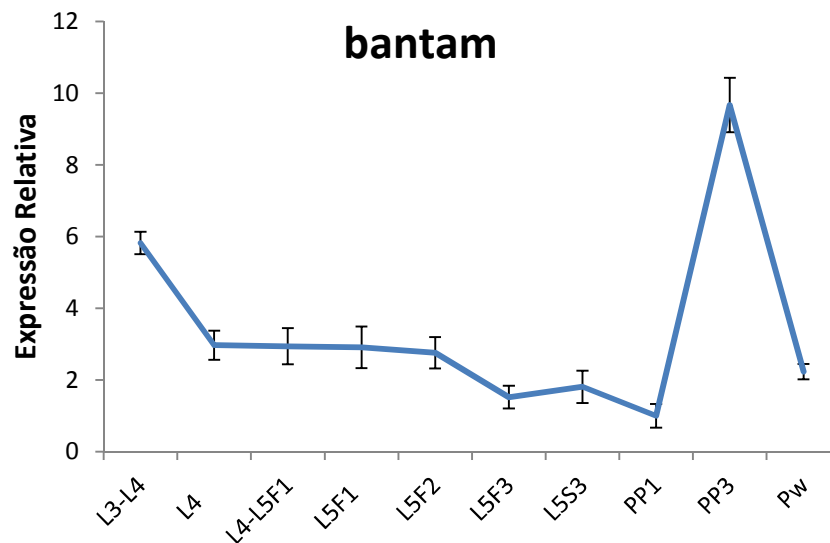
Caygill e Johnston (2008) observaram que a perda de let-7 e de miR-125 promoveu atrasos ou deficiências em processos metamórficos. Foram relatados atrasos do ciclo celular, deficiências no processo apoptótico em células das asas e, também, deficiências na maturação das junções neuromusculares, impedindo a sua diferenciação no momento apropriado, além de alterar o comportamento de adultos de *D. melanogaster*.

Nossos dados sugerem que esses microRNAs atuam de forma coordenada e contribuem em vários processos durante o crescimento e a metamorfose em operárias de *A. mellifera*, participando na regulação do crescimento e ganho de peso de larvas, além de sinalizarem para o processo de muda metamórfica em si.

A expressão de bantam (Figura 18) é maior durante os primeiros estágios larvais, no entanto, apresenta um pico em PP3 (fase que antecede a muda metamórfica) e queda abrupta em pupa (Pw).

Em *D. melanogaster*, as mutações de perda de função de bantam são letais nas fases de pupa (Hipfner et al., 2002). Por outro lado, a superexpressão de bantam induz crescimento excessivo de tecidos devido a um aumento no número de células. Esse microRNA regula vias de sinalização como Hippo e Notch, controlando, assim, o crescimento de órgãos durante o desenvolvimento larval (Edgar, 2006; Thompson e Cohen, 2006; Boulan et al., 2013).

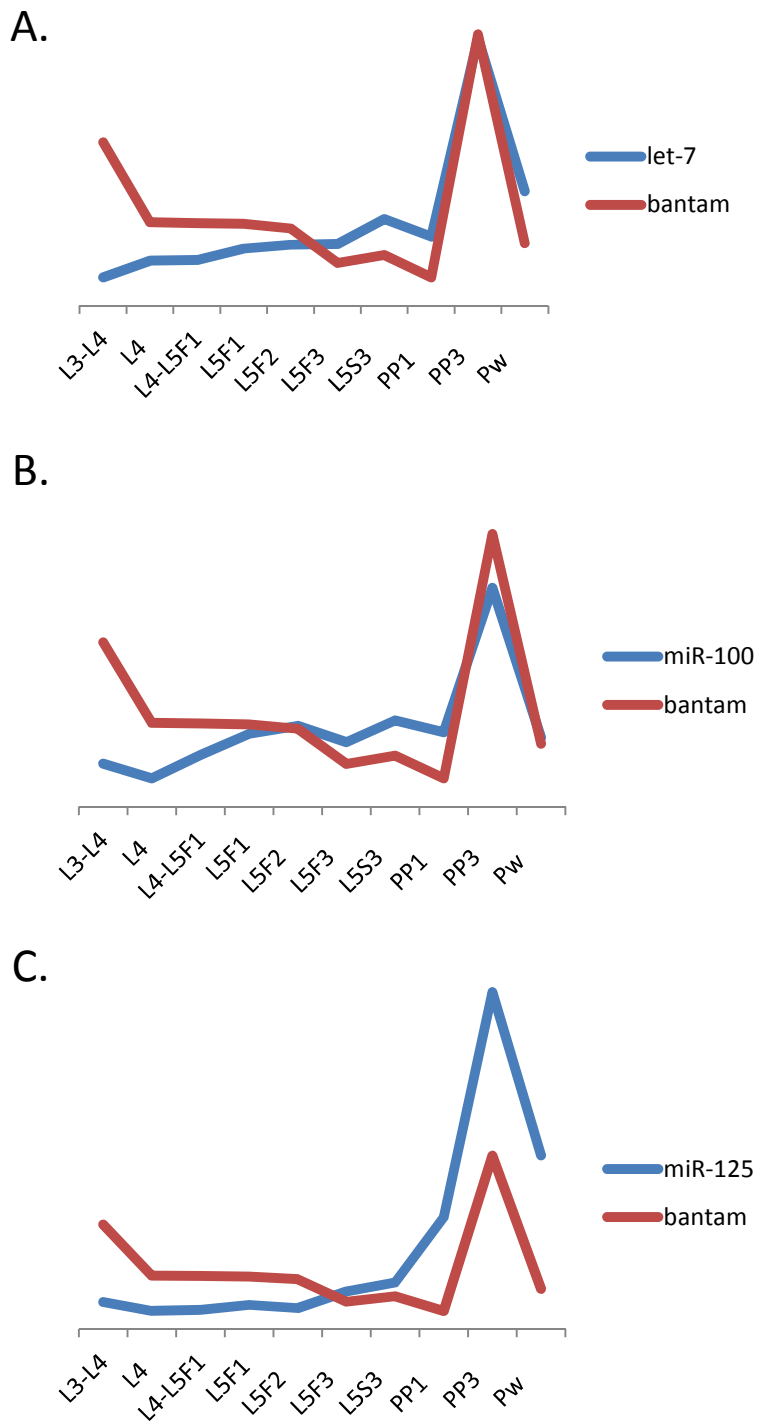
O microRNA bantam apresenta níveis de expressão constantes na parede do corpo, nas glândulas de seda e no intestino em *B. mori* (Liu et al., 2010). Hipfner et al. (2002) e Brennecke et al. (2003) demonstraram que a eliminação de bantam em larvas mutantes de *D. melanogaster* impede a diferenciação dos discos imaginais, tendo graves efeitos sobre o desenvolvimento ontogenético.



**Figura 18:** Expressão relativa do microRNA bantam durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do bantam. As amostras com menor média de expressão (PP1) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa.

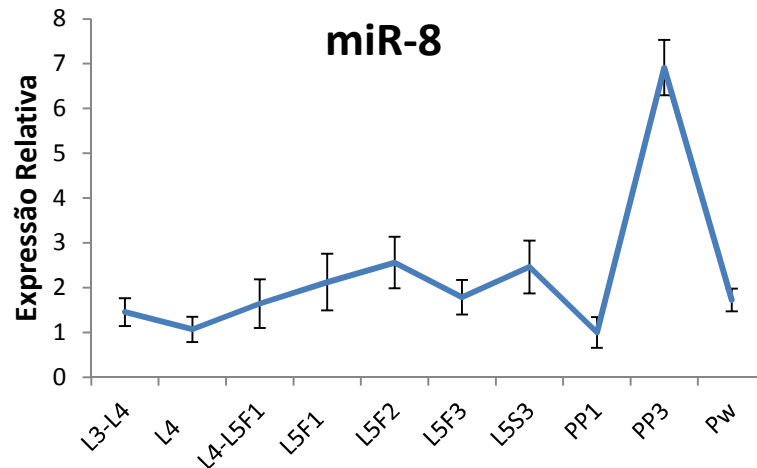
Nossos resultados indicam que, como ocorre em outros insetos, o microRNA bantam parece ser importante no crescimento, na proliferação e diferenciação celular e na metamorfose também no desenvolvimento pós-embrionário de operárias de *A. mellifera*.

Como mencionado na Introdução, bantam reprime a diferenciação das células germinativas, garantindo a manutenção dessas células nos ovários (revisado por Asgari, 2013). Também foi demonstrado que bantam promove o crescimento ao inibir a liberação de ecdisteroides, um papel antagônico ao complexo let-7, miR-100 e miR-125 (Boulan et al., 2013). Nossos dados não permitem extrapolações dessa natureza. No entanto, se plotarmos os dados de expressão de bantam com cada membro do cluster let-7, observamos perfis de expressão opostos aos que ocorrem no desenvolvimento, com mudanças na fase de alimentação do quinto instar larval, culminando num pico comum na muda metamórfica e queda em pupa (Figura 19).



**Figura 19:** Comparação dos perfis de expressão de bantam com os microRNAs let-7 (A), miR-100 (B) e miR-125 (C) no desenvolvimento pós-embriônico de operárias de *A. mellifera*.

A expressão do microRNA mir-8 (Figura 20) é maior durante o último estágio larval (L5) do que em relação aos primeiros estágios (L3-L4), no entanto, apresenta um pico em PP3 (fase que antecede a muda metamórfica) e queda abrupta em pupa (Pw).



**Figura 20:** Expressão relativa do miR-8 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-8. As amostras com menor média de expressão (PP1) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa.

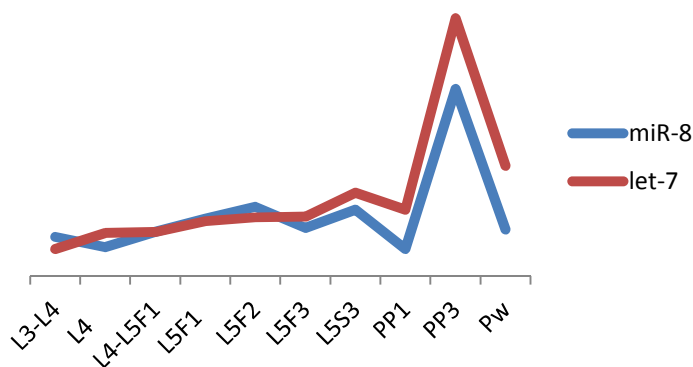
O microRNA mir-8 é altamente conservado filogeneticamente e possui um papel importante no crescimento larval, uma vez que, deficiências nesse microRNA acarretam em má formação de pernas e asas e redução da coordenação neuromuscular em *D. melanogaster*, além de apresentar efeitos colaterais sobre o sistema imune e sobre o tamanho corporal adulto (Lucas e Raikhel, 2013).

Hyun et al. (2009) mostraram que miR-8 e o seu alvo, *U-shaped (Ush)*, promovem a sinalização da insulina e crescimento do corpo em *D. melanogaster*. A sinalização da insulina é uma via chave no crescimento do organismo e detecção de tamanho da larva, sendo assim, uma via importante para a coordenação do crescimento, desenvolvimento apropriado e maturação juvenil (Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002; Demontis e Perrimon, 2009).

Aravin et al. (2003) e Sempere et al. (2003) mostraram que a expressão de miR-8 é reduzida durante a muda metamórfica em *D. melanogaster*, sendo provavelmente regulado por 20E. Como demonstrado por Jin et al. (2012), assim como a expressão da via da insulina, a expressão de mir-8 é antagônica aos títulos de ecdisteroides. Os experimentos de Jin e colaboradores (2012) mostraram que o tratamento de larvas com 20E reduziu

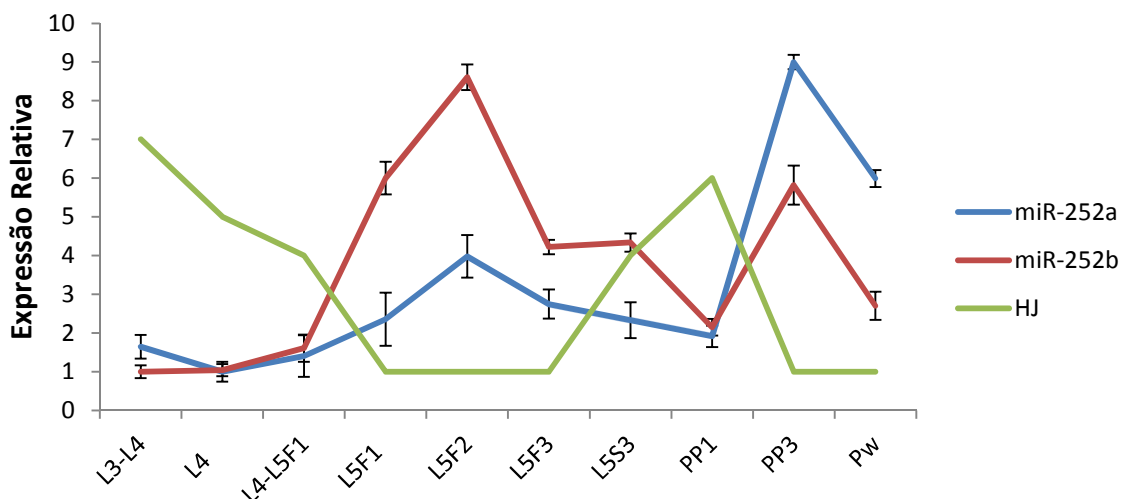
significativamente o nível de miR-8. Além disso, miR-8 também afeta o tamanho final do corpo, uma vez que, o aumento da expressão desse microRNA também promoveu um maior tamanho corporal em pupas de *D. melanogaster* (Jin et al., 2012).

Entretanto, diferentemente do que ocorre em moscas, nossos resultados não apresentaram uma diminuição no momento da muda metamórfica, mas sim, um aumento (Figura 20). Talvez esse resultado antagônico seja uma peculiaridade de *A. mellifera*, mostrando que nesse organismo o miR-8 possa ser regulado por outros fatores que não os níveis de ecdisteroides ou, ainda, que sua expressão seja positivamente correlacionada a esse hormônio, ao contrário do que ocorre em *D. melanogaster*. Em ambos os casos o porquê desse resultado precisa ser investigado. Uma observação interessante é que o perfil desse microRNA é muito semelhante ao de let-7 (Figura 21), apontando para uma atividade coordenada desses dois microRNAs durante o processo de metamorfose.



**Figura 21:** Comparação dos perfis de expressão dos microRNAs let-7 e miR-8 no desenvolvimento pós-embrionário de operárias de *A. mellifera*.

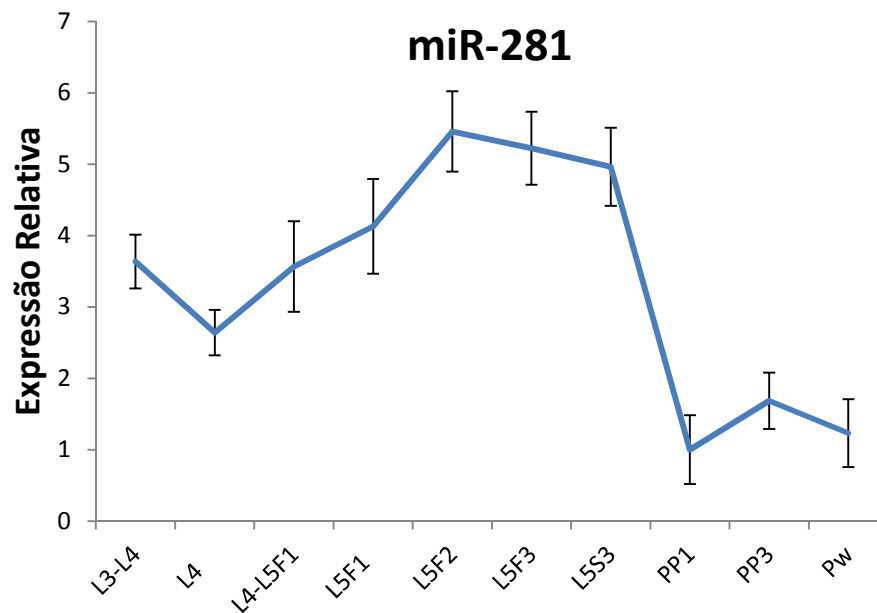
Os miRNAs miR-252a e miR-252b apresentaram perfis de expressão semelhantes entre si (Figura 22). Ambos apresentam uma baixa expressão nas fases iniciais do desenvolvimento larval (da muda L3-L4 até a muda L4-L5F1), e um aumento nas fases de alimentação (L5F). Seus níveis então diminuem no fim da fase de tecelagem de casulo (L5S3) e pupa farata (PP1), mas voltam a aumentar na iminência da muda metamórfica (PP3). Um mesmo pico durante a muda metamórfica foi encontrado por Liu et al. (2010) no corpo gorduroso de *B. mori*.



**Figura 22:** Expressão relativa do miR-252a e do miR-252b durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão de ambos microRNAs. Para miR-252a, as amostras com menor média de expressão (L4) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Para miR-252b, as amostras com menor média de expressão (muda de L3-L4) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. A curva de hormônio juvenil (HJ) não está em escala, porém representa seu perfil no desenvolvimento de operárias.

Jagadeeswaran et al. (2010) encontram perfil semelhante em *B. mori*, com uma expressão basal de miR-252 durante as primeiras fases larvais, um aumento durante a fase de tecelagem de casulo e, em seguida, uma diminuição após metamorfose. Ainda que similares, os perfis de miR-252a e miR-252b se contrastam com relação a intensidade dos picos observados, isto é, existe uma alternância quanto aos valores mais altos de expressão desses miRNAs ao longo do desenvolvimento. Enquanto o miR-252b apresenta um pico maior nas fases de alimentação (L5F), o miR-252a apresenta um pico maior na fase anterior a muda metamórfica (PP3). Fazendo uma análise comparativa, esses miRNAs apresentam um padrão oposto aos títulos de HJ circulantes na hemolinfa, indicando um possível mecanismo regulador (Figura 22). Em *B. germanica*, o microRNA mir-252 foi inibido durante a última fase ninfal em resposta ao tratamento com 20E. Dessa forma, sugere-se que o perfil de expressão desse microRNA possa ser coordenado tanto com os títulos de HJ quanto com os de 20E.

Diferentemente do que observado nos outros microRNAs, o mir-281 (Figura 23) possui seu maior pico de expressão durante as fases de alimentação (L5F) e menor expressão nas fases finais do desenvolvimento larval (PP1, PP3) e na pupa (Pw).

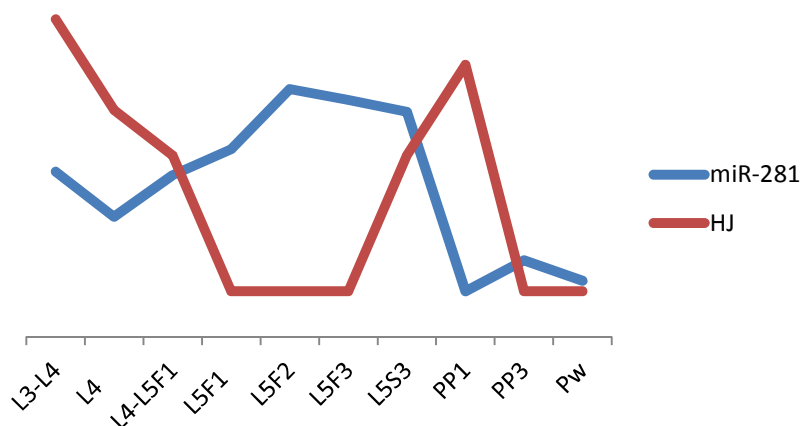


**Figura 23:** Expressão relativa do miR-281 durante as fases de desenvolvimento larval (muda L3-L4, L4, muda L4-L5F1, L5F1, L5F2, L5F3, L5S3), pupa farata (PP1 e PP3) e pupa de olho branco (Pw). A expressão de U5 foi utilizada como normalizador na expressão do miR-281. As amostras com menor média de expressão (PP1) foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa.

O miR-281 é um microRNA conservado e encontrado apenas em invertebrados. Em *B. mori* miR-281 é expresso em vários tecidos durante a metamorfose (Liu et al., 2010), no entanto, a sua função ainda não foi determinada. Jiang et al. (2013) verificaram através de predição *in silico* que a 3'UTR do mRNA codificador de EcR-B pode ser alvo de miR-281, dessa forma, provavelmente, o miR-281 é um elemento regulador na expressão EcR-B em *B. mori*.

Em larvas de último estágio tratadas com 20E durante o quarto estágio larval não ocorre alterações generalizadas na transcrição desse microRNA, entretanto, ocorre uma diminuição particular da expressão de miR-281 nos túbulos de Malpighi em *B. mori* durante o último estágio larval. E em larvas tratadas com metopreno (análogo ao HJ) não ocorrem alteração na expressão de transcritos, indicando que o miR-281 é regulado por 20E, mas não por HJ (Jiang et al., 2013). Por outro lado, a expressão de miR-281 se contrapõe à curva de HJ (Figura 24), assim como mostramos para miR-252a e miR-252b, sugerindo novamente um mecanismo de regulação.





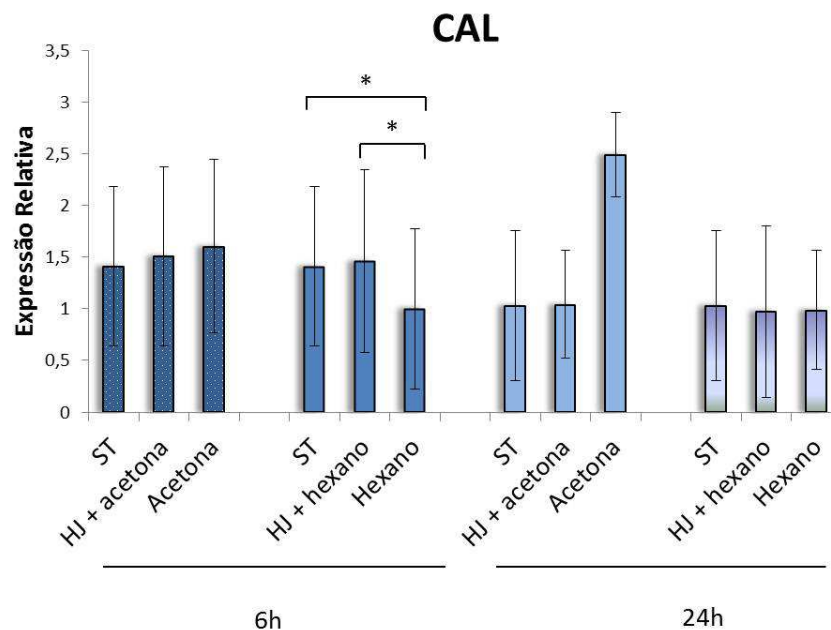
**Figura 24:** Comparação do perfil de expressão do miR-281 com os títulos de HJ ao longo do desenvolvimento pós-embriônico de operárias de *A. mellifera*. A curva de HJ não está em escala.

Nossos resultados são coerentes com os achados de Jiang et al. (2013) em que durante o desenvolvimento larval, a expressão de miR-281 é mantida a um nível relativamente elevado, o que restringe a expressão EcR, mesmo quando é tratado com 20E. No entanto, durante a fase de muda metamórfica, expressão de miR-281 diminuiu drasticamente, permitindo a expressão de EcR. Dessa forma, o miR-281 parece facilitar mudanças rápidas de títulos de 20E, o que é necessário para a transição larva-pupa.

#### 4.5 Avaliação de tratamentos hormonais (HJ ou 20E) sobre o desenvolvimento e expressão de Cal, GCE, IDGF4, FTZ-F1 e Kr-h1

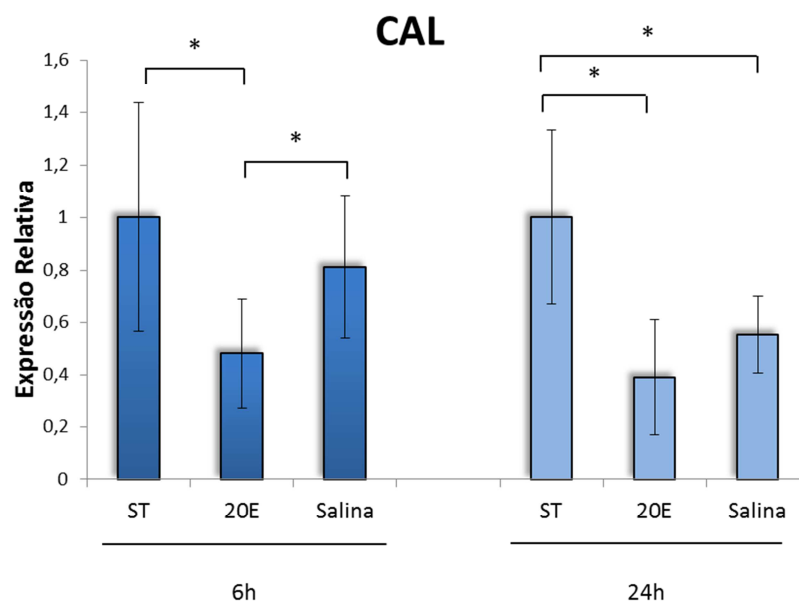
Os dados apresentados a seguir representam as médias de expressão para cada um dos genes avaliados após o tratamento hormonal.

Nenhum dos grupos analisados apresentou alterações significativas na abundância de transcritos de Cal frente à aplicação de HJ, com exceção do grupo tratado com HJ+hexano em relação ao controle hexano após 6h do tratamento (Figura 25).



**Figura 25:** Expressão relativa do gene codificador de Cal em operárias de *Apis mellifera* na fase de pupa farata (PP3), submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ, n= 6). Abelhas sem tratamento (ST, n=6), tratadas com acetona (n=6) e tratadas com hexano (n=6) foram utilizadas como controles. A expressão foi mensurada 6 e 24 horas após os tratamentos. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene Cal. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Quando analisada a expressão de Cal nos grupos tratados com 20E, pode-se observar uma diminuição significativa na expressão desse gene em relação ao controle sem tratamento e ao grupo tratado com salina no tempo de 6 horas (Figura 26). No entanto, no tempo de 24h, houve diferença significativa dos indivíduos submetidos ao tratamento com 20E em relação ao controle sem tratamento, mas não em relação ao grupo tratado com salina (Figura 26).



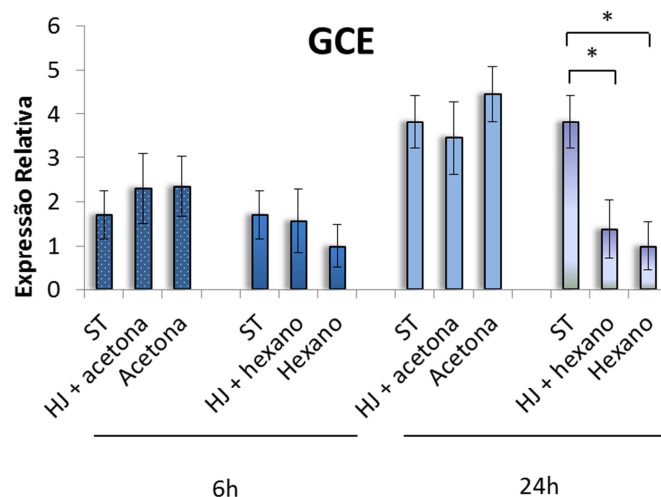
**Figura 26:** Expressão relativa do gene codificador de Cal em operárias de *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com 20-hidroxiecdisona (20E, n=6 para 6h; n=5 para 24h). Abelhas sem tratamento (ST, n=6 para 6h; n=5 para 24h) e tratadas com Salina (n=6 para 6h; n=5 para 24h) foram utilizadas como controles. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene Cal. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Segundo Liu et al. (2011) durante as fases larvais, quando os níveis de hormônio juvenil são altos, Cal apresenta-se na forma não-fosforilada e interage com USP+Met. Tal complexo se liga a elementos de resposta ao hormônio juvenil situados nos promotores de alguns genes, ativando-os. Durante a metamorfose e na fase pupal, quando os níveis de 20E estão altos, Cal é fosforilado por PKC (proteína quinase C), não se ligando a USP+Met. Neste momento do desenvolvimento, USP se liga a EcR formando o receptor de ecdisteroides. O complexo 20E+EcR+USP então se liga aos elementos de resposta a ecdisona, também presentes nos promotores de alguns genes e iniciando a transcrição dos mesmos (Liu et al., 2011). Segundo o modelo apresentado por Ament e colaboradores (2012), Cal se interage fisicamente com os fatores de transcrição USP, MET, EcR, e FKBP39 e, juntos, podem modular a ação do HJ ao menos para operárias adultas de *A. mellifera*. Na ausência de HJ o complexo se liga no promotor de genes HJ-responsivos, inibindo-os. Na presença de HJ, o mesmo complexo se liga no promotor dos mesmos genes, porém ativando-os (por exemplo o gene E75 é um alvo sob regulação desse complexo).

Li et al. (2007) identificaram que Cal pode ser induzida por HJ em *D. melanogaster*. Segundo Liu e colaboradores (2011), o gene codificador de Cal em *Helicoverpa armigera* é regulado tanto por 20E quando por metopreno (análogo ao HJ), os quais promovem o aumento da expressão desse gene. Esses hormônios foram aplicados em cultura de células epidérmicas e *in vivo*. O efeito positivo do HJ e do 20E sobre a expressão de Cal nesse inseto ocorreu a partir de 2h após o tratamento. Como mostra a Figura 26, não temos evidências de efeitos de HJ na expressão de Cal em larvas, demonstrando que o papel de Cal na sinalização de HJ ainda não está completamente elucidado em *A. mellifera*. Novas doses de HJ devem ser testadas em trabalhos futuros para esclarecer a questão.

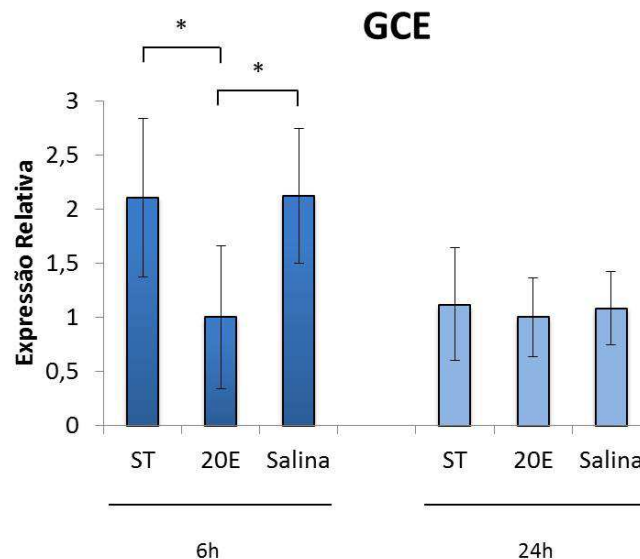
Por outro lado, nosso estudo demonstrou que o gene Cal é modulado por 20E. Sua expressão é reprimida em indivíduos tratados com 20E (Figura 26), diferentemente do que ocorre em *H. armigera* (Liu et al., 2011) e *D. melanogaster* (Li et al. 2007), onde Cal foi induzida por 20E. Embora contrastantes, nossos achados via tratamento hormonal reiteram que Cal seja regulada negativamente pelo 20E, uma vez que esse gene apresentou elevada expressão quando os níveis de 20E foram basais (ver fase PP3 da Figura 8).

Em relação à análise da expressão de GCE, os indivíduos submetidos ao tratamento com HJ (HJ+hexano) no tempo de 24h, em particular, apresentaram diferenças significativas em relação aos dois grupos controle (Figura 27).



**Figura 27:** Expressão relativa do gene codificador de GCE de operárias em *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ, n= 6). Abelhas sem tratamento (ST, n=6), tratadas com acetona (n=6) e tratadas com hexano (n=6) foram utilizadas como controles. A expressão foi mensurada 6 e 24 horas após os tratamentos. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene GCE. A média de expressão das amostras do grupo ST foram iguais a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

O tratamento com 20E diminuiu de forma significativa a expressão de GCE no tempo de 6h em relação aos controles. Porém, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada no tempo de 24h após os tratamentos (Figura 28).



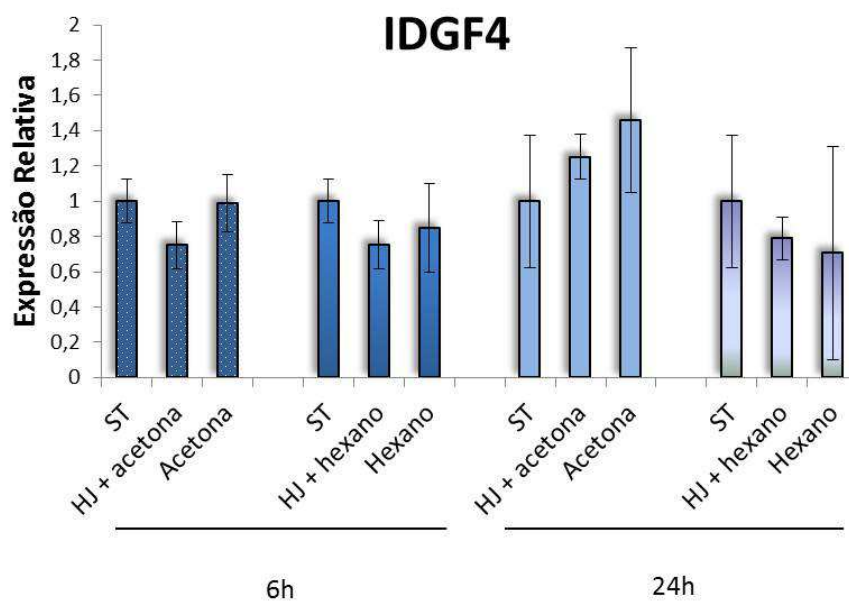
**Figura 28:** Expressão do gene codificador de GCE em operárias de *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com 20-hidroxiecdisona (20E, n=6 para 6h; n=5 para 24h). Abelhas sem tratamento (ST, n=6 para 6h; n=5 para 24h) e tratadas com Salina (n=6 para 6h; n=5 para 24h) foram utilizadas como controles. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene GCE. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Em trabalhos com operárias adultas de *A. mellifera*, Ament e colaboradores (2012) demonstraram um aumento da expressão de USP quando os indivíduos foram tratados com HJ. Os genes GCE e USP participam da mesma via, sendo ambos fortes candidatos a receptor de HJ. Os modelos vigentes indicam que USP e GCE se ligam em complexos proteicos que funcionam como fatores de transcrição. Como GCE é um dos possíveis candidatos a receptor de HJ (suportado pela nossa análise de modelagem molecular, ver Figura 10), esperava-se que a expressão de GCE aumentasse com o tratamento hormonal. No entanto, nossos dados demonstram que GCE não foi induzido por HJ. Ou, ainda, que o hexano tenha perturbado de alguma forma a expressão de GCE, de tal forma que os dados desse grupo não se equiparam aos do grupo sem tratamento. É possível também que, em decorrência da dose de HJ aplicada e do tempo de exposição, os dados não sejam claros.

Nossos achados, ainda que inconclusivos, não excluem que o HJ module a expressão de GCE.

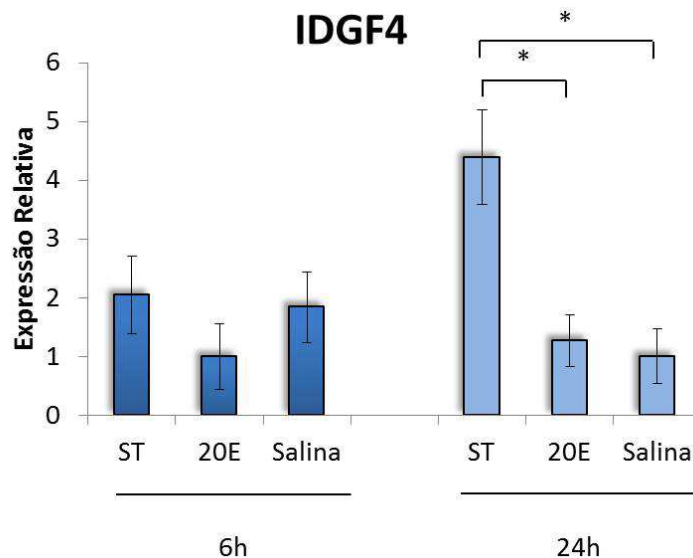
Guo et al. (2012) demonstraram que Met (leia-se GCE) é necessário para ação de 20E durante a metamorfose de *B. mori*, uma vez essa proteína interage fisicamente com ECR-USP, os quais formam um complexo DNA-proteína com os elementos de resposta ao 20E (EcRE). Dessa forma, como o esperado, em nosso estudo, a expressão de GCE (Met em *B. mori*), foi afetada por 20E (Figura 28). Entretanto, os resultados apresentados por Guo et al. (2012) indicam que Met é regulado positivamente, enquanto nossos resultados indicam que GCE é regulado negativamente por 20E (como também sugere a Figura 9, em PP3).

Nossos dados de expressão gênica de IDGF4 dos grupos tratados com HJ *versus* os grupos tratados com acetona, hexano e sem tratamento, para os tempos de 6 e 24 horas, revelaram não haver diferença significativa (Figura 29).



**Figura 29:** Expressão relativa do gene codificador de IDGF de operárias me *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ, n= 6). Abelhas sem tratamento (ST, n=6), tratadas com acetona (n=6) e tratadas com hexano (n=6) foram utilizadas como controles. A expressão foi mensurada 6 e 24 horas após os tratamentos. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene IDGF. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Em relação aos indivíduos submetidos ao tratamento com 20E, para o tempo de 6h, não houve diferença entre os grupos tratados e não tratados no tocante a expressão de IDGF4 (Figura 30). No entanto, no tempo de 24h notou-se que o grupo tratado com 20E apresentou uma diminuição significativa da expressão de IDGF4 em relação ao controle sem tratamento, mas não ao grupo tratado com salina (Figura 30).



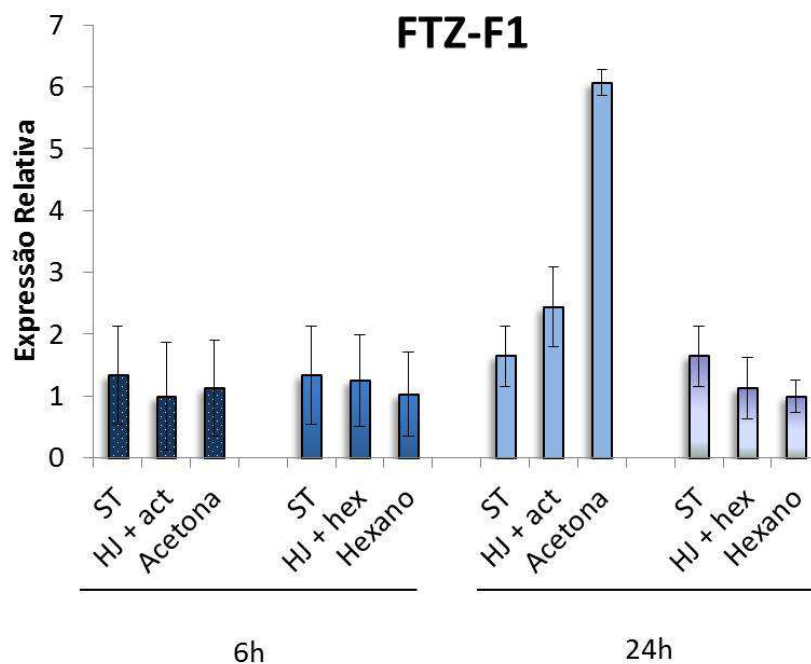
**Figura 30:** Expressão relativa do gene codificador de IDGF4 em operárias de *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com 20-hidroxicdisona (20E, n=6 para 6h; n=5 para 24h). Abelhas sem tratamento (ST, n=6 para 6h; n=5 para 24h) e tratadas com Salina (n=6 para 6h; n=5 para 24h) foram utilizadas como controles. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene IDGF4. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Até o momento, nenhum dado na literatura indica que IDGF4 participe na via de sinalização do HJ. Dessa forma, como esperado, nossos dados indicam que IDGF4 não é regulado por HJ. No entanto, acredita-se que IDGF4 seja induzido por 20-hidroxicdisona e que sua ativação esteja envolvida com processos de morte celular programada (Tsuzuki et al., 2001). Ainda que antagônicas, ambas as funções (fator de crescimento *versus* morte celular programada) são pertinentes ao conjunto de eventos moleculares relacionados à metamorfose.

Dessa forma, IDGF4 parece afetar os processos de desenvolvimento sem grandes influências hormonais. Ou, ainda, nossa amostragem não foi suficiente para detectar diferenças significativas no tempo de 6 horas uma vez que a diferença entre os grupos sem

tratamento e grupo 20E foi sugestiva ( $p < 0,068$ ). Fujita et al. (2010) descobriram que IDGF4 é secretado a partir do sistema salivar de *A. mellifera*, assim, IDGF4 afeta a fisiologia e o crescimento dos indivíduos da colônia através da nutrição, sendo assim um provável fator epigenético.

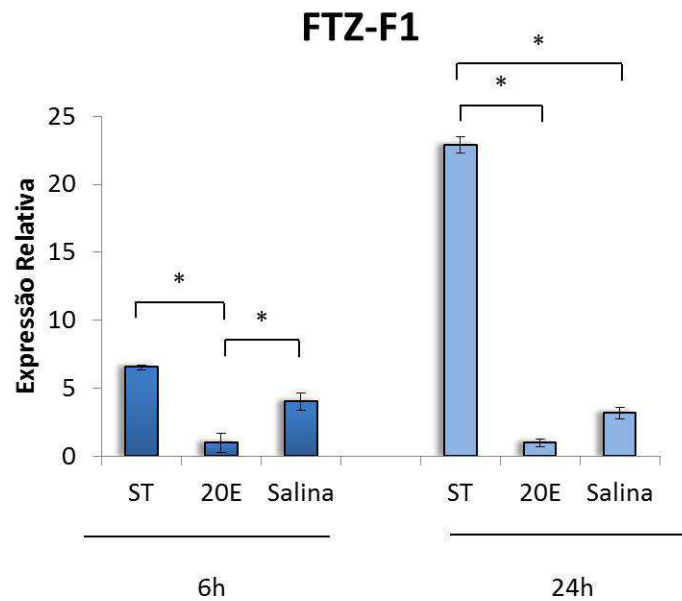
A abundância de transcritos de FTZ-F1 não foi afetada por HJ+acetona nem HJ+hexano em relação aos grupos controle (Sem tratamento, Acetona e Hexano) para ambos os tempos analisados (Figura 31).



**Figura 31:** Expressão relativa do gene codificador de FTZ-F1 de operárias de *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ,  $n = 6$ ). Abelhas sem tratamento (ST,  $n = 6$ ), tratadas com acetona ( $n = 6$ ) e tratadas com hexano ( $n = 6$ ) foram utilizadas como controles. A expressão foi mensurada 6 e 24 horas após os tratamentos. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene FTZ-F1. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Quando analisada a expressão de FTZ-1 no grupo tratado com 20E, no tempo de 6 horas, observamos uma diminuição significativa na expressão desse gene em relação aos grupos controle (Figura 32). No tempo de 24h, embora tenha havido uma diferença significativa dos indivíduos submetidos ao tratamento com 20E em relação ao controle sem tratamento, não houve diferença em relação ao grupo tratado com salina (Figura 32).



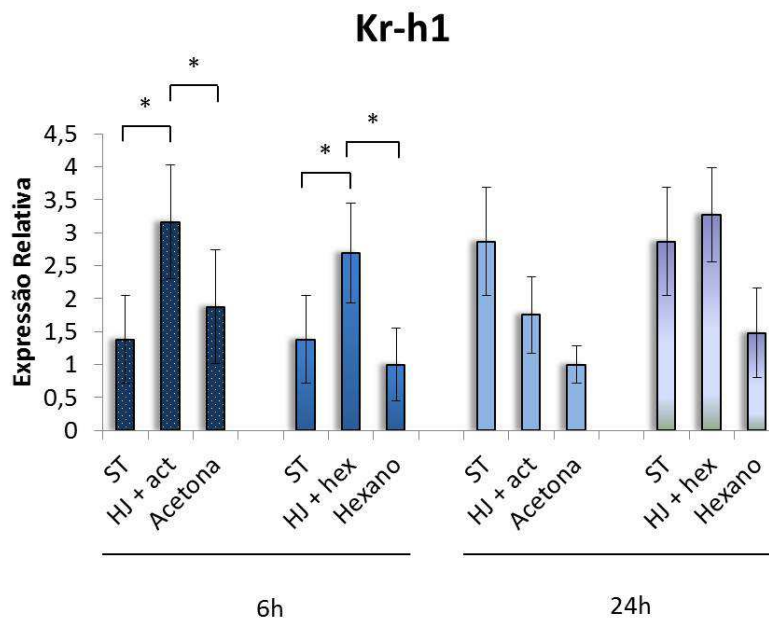


**Figura 32:** Expressão relativa do gene codificador de FTZ-F1 em operárias de *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com 20-hidroxiecdisona (20E, n=6 para 6h; n=5 para 24h). Abelhas sem tratamento (ST, n=6 para 6h; n=5 para 24h) e tratadas com Salina (n=6 para 6h; n=5 para 24h) foram utilizadas como controles. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene FTZ-F1. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Broadus et al. (1999) descobriram que mutações em FTZ-F1 são letais, por perturbarem a via de sinalização de 20E no início da metamorfose de *D. melanogaster*. Normalmente, FTZ-F1 é induzida na fase de pupa farata, após um aumento dos níveis de 20E, ou seja, um período com um elevado nível de 20E é seguido por uma baixa expressão de FTZ-F1 (Broadus et al, 1999;. Woodard et ai, 1994, Yamada et al, 2000). Contudo, nossos dados indicam que FTZ-F1 é reprimido por 20E (Figura 32) e são corroborados por Rewitz et al. (2010). Estes autores estudaram o desenvolvimento de *D. melanogaster*, demonstrando que níveis elevados de 20E reprimem a expressão de FTZ-F1 durante a pré-pupa, o que causa letalidade nos indivíduos. O gene FTZ-F1 codifica um fator de transcrição necessário durante a metamorfose (Beckstead et al., 2007). Dessa forma, existe a possibilidade de que FTZ-F1 desempenhe um importante papel na sinalização de 20E.

A abundância de transcritos de Kr-h1 foi afetada positivamente por HJ após 6 horas de tratamento, comparando-se aos grupos controle (Figura 33). Em relação ao tempo de

24h, contudo, nenhum dos grupos analisados apresentou alterações significativas entre si (Figura 33).



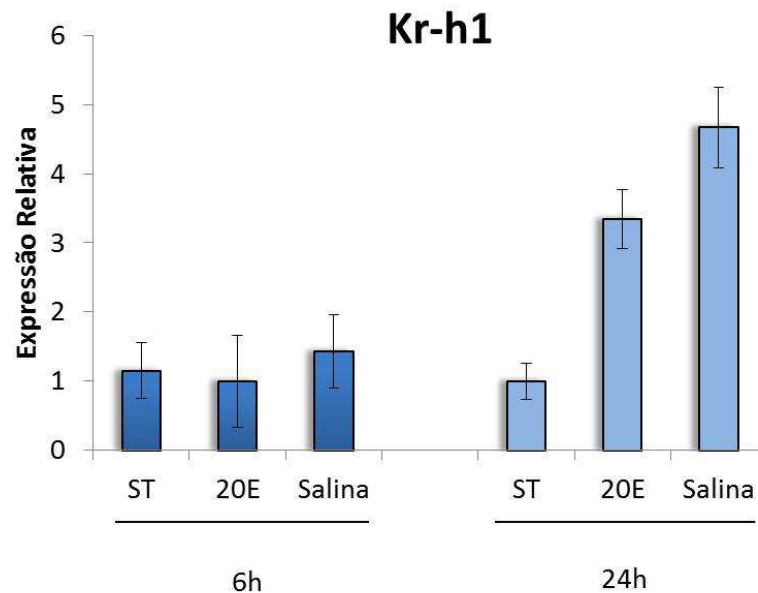
**Figura 33:** Expressão relativa do gene codificador de Kr-h1 de operárias me *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com hormônio juvenil (HJ, n= 6). Abelhas sem tratamento (ST, n=6), tratadas com acetona (n=6) e tratadas com hexano (n=6) foram utilizadas como controles. A expressão foi mensurada 6 e 24 horas após os tratamentos. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene Kr-h1. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

A comparação dos dados de expressão gênica de Kr-h1 entre os grupos tratados com 20E em relação aos grupos salina e sem tratamento, para os tempos de 6 e 24 horas, revelaram não haver diferença significativa (Figura 34).

Como já mencionado, a transcrição de Kr-H1 permanece baixa durante a maior parte da transição metamórfica, momento em que os títulos de HJ também estão baixos, sugerindo uma regulação hormonal deste gene (revisado por Jindra et al., 2013).

A expressão de Kr-h1 aumentou após os organismos serem submetidos ao tratamento com HJ para ambos os solventes testados: Acetona e Hexano. Nossos dados corroboram os encontrados em *D. melanogaster* (Minakuchi et al., 2008), em *T. castaneum* (Minakuchi et al., 2009), em *P. apterus* (Konopova et al., 2011), em *B. germanica* (Lozano e Bellés 2011) e em *B. mori* (Kayukawa et al., 2012), sendo este gene estritamente dependente e induzido por HJ nessas quatro espécies. Dessa forma, a ausência de Kr-h1

causa metamorfose precoce, e a não diminuição de sua expressão antes da ocorrência da metamorfose, mantém o indivíduo na fase larval, impedindo a muda metamórfica (Konopova et al., 2011).



**Figura 34:** Expressão relativa do gene codificador de Kr-h1 em operárias de *Apis mellifera* na fase PP3, submetidas a tratamento com 20-hidroxicdisona (20E, n=6 para 6h; n=5 para 24h). Abelhas sem tratamento (ST, n=6 para 6h; n=5 para 24h) e tratadas com Salina (n=6 para 6h; n=5 para 24h) foram utilizadas como controles. A expressão do gene codificador da proteína ribossomal rp49 foi utilizada como normalizador da expressão do gene Kr-h1. A média de expressão das amostras do grupo ST foram igualadas a 1 e as demais medidas tornadas proporcionais a essa. Usaram-se os testes ANOVA e Tukey-HSD, considerando  $p < 0,05$ .

Ao contrário do encontrado por Pecasse et al. (2000) em *D. melanogaster*, nossos resultados mostraram que a expressão de Kr-h1 não é afetada pelo tratamento com 20E em nenhum dos tempos analisados. Esse resultado também foi encontrado por Minakuchi et al. (2009), que estudando o desenvolvimento de *T. castaneum* constatou que a expressão de Kr-h1 é induzida por HJ, porém não é afetada por 20E. Portanto, Kr-h1 provavelmente não está envolvido na sinalização por 20E, mas representa um gene importante para a metamorfose sendo positivamente regulado por HJ.

Moda et al. (2013) demonstraram que a expressão de Kr-h1 no cérebro de larvas L5F2 de rainhas de *A. mellifera* é significativamente maior que no cérebro de larvas de operárias na mesma fase. Em L5F2, os títulos de HJ circulantes na hemolinfa são mais elevados em rainhas em comparação às operárias. Parece-nos coerente supor que o

aumento de HJ em pré-pupas de operárias, induzido artificialmente pela administração tópica desse hormônio, ativa a expressão de mais transcritos de Kr-h1 e, talvez, simule um fenótipo molecular mais próximo das rainhas.

Cabe ressaltar que, em experimentos anteriores (não apresentados), usamos o Ringer (NaCl 5,0 g; KCl 0,42 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25 g), uma mistura mais concentrada de sais que a salina. O Ringer perturbou de tal forma nossos dados que optamos por repetir os experimentos usando a salina como controle, pois esta é considerada uma solução fisiológica, e assim não esperávamos mudanças drásticas na expressão gênica. No entanto, observamos novamente alguma perturbação. Sabe-se que a quantidade e qualidade do alimento larval é crítico no desenvolvimento de abelhas (ver Leimar et al., 2012). Mudanças na concentração de sais e/ou diluição da dieta, podem causar desequilíbrio osmótico e afetar o desenvolvimento. Além disso, compostos orgânicos, como a acetona e o hexano, também podem influenciar os dados (Dra. Vera Figueiredo, comunicação pessoal). A acetona, em particular, mostrou-se tóxica em experimentos com insetos (Tunç et al., 1997; Pourmirza, 2006). Comparativamente, nossos dados mostram que o hexano perturba menos que a acetona. Alguns trabalhos com tratamentos hormonais usam o DMSO (Dimetilsulfóxido) como solvente, não testado neste estudo. Essas observações nos alerta para necessidade de modificações nos solventes e redefinição dos grupos controle durante a repetição dos experimentos.

#### **4.6 Progressão do desenvolvimento após os tratamentos hormonais**

As figuras abaixo mostram fotos registradas após os tratamentos. Não houve diferenças morfológicas observáveis entre os grupos após 6h de tratamento com ambos os hormônios (dados não mostrados).

Após 48h dos experimentos, é possível visualizar indivíduos tratados com HJ e seus respectivos controles (Figura 35), onde o controle sem tratamento é equivalente ao tratamento com HJ+acetona, estando na fase de pupa branca (Pw). Observamos também que as amostras tratadas apenas com acetona apresentaram problemas no desenvolvimento. Em suma, a Figura 35 sugere duas conclusões: (i) o HJ parece proteger as abelhas contra a ação tóxica da acetona e (ii) o HJ, diluído em hexano, atrasou o desenvolvimento e impediu a muda metamórfica, mantendo as formas imaturas, como esperado. Excetuando-se Cal, GCE e IDGF4, certamente outros genes são modulados por HJ nas etapas de transição larva-pupa. Se retomarmos a Figura 27, GCE responde negativamente ao tratamento com HJ, o que era de alguma forma esperado. Mas o tratamento com o solvente hexano, apresentado na mesma Figura, afetou a expressão de GCE de tal forma que nos impede de concluir sobre a existência de uma interação gene-

hormônio. Não podemos deixar de especular que o hexano, ainda que tenha sido superior à acetona para a realização dos experimentos, não parece ser um bom solvente para a análise de GCE, em particular, no contexto da metamorfose.



**Figura 35:** Registro de pupas faratas 48h após tratamento - A. Controle sem tratamento. B. Tratamento com hexano. C. Tratamento com hormônio juvenil e hexano. D. Controle com acetona. E. Tratamento com hormônio juvenil e acetona. As figuras não estão em escala.

Após 48 horas dos experimentos de administração de 20E, o desenvolvimento das abelhas dos grupos controle (sem tratamento e salina) parecia mais adiantado que o das abelhas do grupo tratado com 20E (Figura 36). No entanto, um fato curioso: observamos tanto uma mortalidade progressiva nos controles quanto foram os únicos grupos em que algumas abelhas emergiram como adultos. Também intrigante, os indivíduos tratados com 20E não atingiram a fase pupal e, ainda, sobreviveram pelo menos 144 horas após os tratamentos (Figura 37). Considerando essas 144 horas, esperaríamos que os indivíduos estivessem na fase Pbl (pupa de olho marrom com tórax levemente pigmentado).



**Figura 36:** Registro de pupas faratas 6h após os tratamentos com 20E - A. Controle sem tratamento. B. Tratamento com salina. C. Tratamento com 20E e salina. As figuras não estão em escala.

Em condições naturais, ocorre um pico natural de 20E nas pupas faratas PP2 de operárias. Os níveis desse hormônio voltam a ser basais em PP3, desencadeando assim a muda metamórfica. Após o tratamento com 20E, ficou evidente a ocorrência de um atraso no desenvolvimento dos indivíduos. O tratamento com 20E ocorreu justamente na fase PP2, ou seja, induzimos uma sobrecarga desse hormônio, que parece ter se mantido muitas horas após o tratamento (Figura 37). Dessa forma, não havendo a queda esperada desse hormônio (devido ao tratamento), impediu-se a ocorrência da muda metamórfica (que ocorreria ao final de PP3). Se observarmos a região anterior desses indivíduos, notamos a formação e pigmentação dos olhos. Podemos, ainda, especular que o excesso de 20E interfere na ecdise, na remodelagem de outras estruturas da cabeça, além da formação do tórax e do abdômen.

Com relação à expressão gênica, os picos esperados de GCE, Cal e FTZ-F1 e a diminuição da expressão de Kr-h1 no final da fase de pupa farata (PP3) não ocorreram. Nossa hipótese é que a expressão máxima desses genes só ocorre sob baixos níveis de 20E, o que foi impedido pela “overdose” hormonal resultante do tratamento. Outra possibilidade é que talvez os indivíduos até tenham metabolizado o 20E, promovendo sua queda, mas num momento fora da janela temporal esperada para a ocorrência da muda metamórfica. Ou ainda que, por ter ocorrido um aumento na expressão de Kr-h1 em PP3, pode ter impedido a transição larval-pupal.

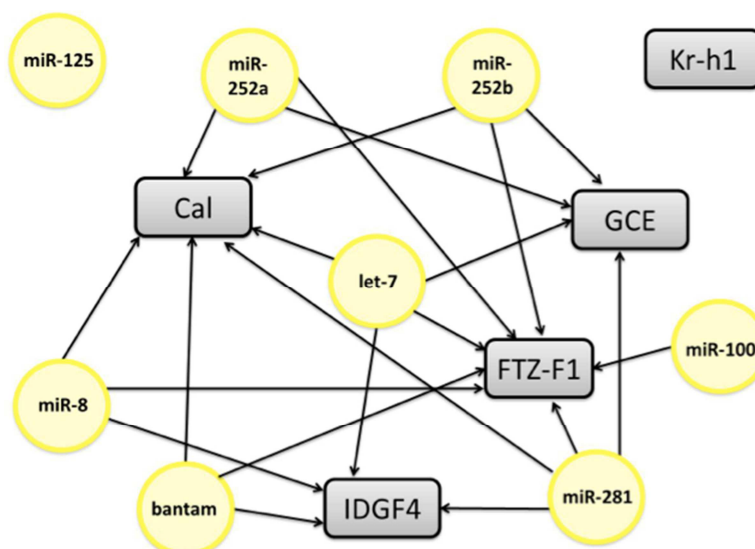


**Figura 37:** Registro de pupas faratas 144h após os tratamentos com 20E. A figura não está em escala.

#### **4.7 Considerações finais**

Em busca de um modelo de regulação, fizemos análises de predição de sítios de microRNAs nas regiões 3'UTR dos genes codificadores de proteínas. Usamos uma análise conservadora, considerando complementaridade perfeita na região *seed*, sem aceitar

pareamentos G:U (conforme Nunes et al., 2013). Com exceção de Kr-h1 e miR-125, todos os demais elementos genéticos estão conectados (Figura 28). Trata-se de uma rede parcial e acreditamos que o uso de parâmetros menos estridentes e a realização análises funcionais deverão incluir Kr-h1 e miR-125 no modelo.



**Figura 38:** Modelo de interação dos elementos genéticos analisados nesse estudo, baseado em predições de sítios de ligação perfeita da região *seed* dos microRNAs com a porção 3'UTR dos genes codificadores de proteínas. Os dados foram extraídos do miRBase, GenBank (NCBI) e as análises foram realizadas usando o programa RNAHybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>).

Ao fim desse estudo, percebemos certas limitações, especialmente pelo fato de termos utilizado o corpo praticamente inteiro dos animais (exceto a cabeça), o que dificulta propor conclusões mais robustas. No entanto, os dados são muito coerentes com o que já sabemos sobre os processos de crescimento, ecdise e metamorfose em insetos e, em particular, em abelhas. Hipotetizamos a existência de circuitos genéticos secundários (*downstream*) que respondem à ação inicial dos fatores do eixo neuroendócrino que, juntos controlam toda a ontogênese. Os nossos achados apontam fortemente que os elementos genéticos que estudamos se interagem entre si, em redes gênicas complexas, e aumentam a compreensão sobre o controle do desenvolvimento pós-embriônico em operárias de *A. mellifera*, especialmente na sinalização do comprometimento com a metamorfose.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---



## REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Ambros V. 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107(7): 823-826.
- Ament SA, Wang Y, Chen CC, Blatti CA, Hong F, Liang ZS, Negre N, White KP, Rodriguez-Zas SL, Mizzen CA, Sinha S, Zhong S, Robinson GE. 2012. The transcription factor ultraspiracle influences honey bee social behavior and behavior-related gene expression. *PLoS Genetics* 8(3): e1002596.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Development Cell* 5: 337–350.
- Asgari S. 2013. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:388-397.
- Bashirullah A, Pasquinelli AE, Kiger AA, Perrimon N, Ruvkun G, Thummel CS. 2003. Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* 259(1):1–8.
- Beckstead RB, Lam G, Thummel CS. 2007. Specific transcriptional responses to juvenile hormone and ecdysone in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 570–578.
- Behura SK. 2007. Insect microRNAs: Structure, function and evolution. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 37(1):3-9.
- Boleli IC, Simões ZLP, Hartfelder K. 1998. The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. *Journal of Morphology* 236: 139–149.
- Boulan L, Martin D, Milan M. 2013. bantam miRNA promotes systemic growth by connecting insulin signaling and ecdysone production. *Current Biology* 23: 473–478.
- Breathnach R, Chambon P. 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annual Review of Biochemistry* 50: 349–383.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113(1): 25-36.
- Broadus J, McCabe JR, Endrizzi B, Thummel CS, Woodard CT. 1999. The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Molecular Cell* 3(2): 143-149.

- Callier V, Nijhout HF. 2011. Control of body size by oxygen supply reveals size-dependent and size-independent mechanisms of molting and metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(35): 14664-14669.
- Caygill EE, Johnston LA. 2008. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the let-7 and miR-125 heterochronic microRNAs. *Current Biology* 18(13): 943-950.
- Davidson E. 2001. Genomic regulatory systems: Development and evolution. Academic Press; San Diego, CA.
- Dekel I, Russek N, Jones T, Mortin MA, Katzav S. 2000. Identification of the *Drosophila melanogaster* homologue of the mammalian signal transducer protein, Vav. *FEBS Letters* 472(1): 99-104.
- Demontis F, Perrimon N. 2009. Integration of Insulin receptor/Foxo signaling and dMyc activity during muscle growth regulates body size in *Drosophila*. *Development* 136: 983-993.
- Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Bernardo T, Otte V, DiFilippo R, Bryan H. 2011. The *Drosophila* FTZ-F1 nuclear receptor mediates juvenile hormone activation of E75A gene expression through an intracellular pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 286(38): 33689-33700.
- Dubrovsky EB. 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology Metabolism* 16(1): 6-11.
- Edgar BA, Orr-Weaver TL. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105(3): 297-306.
- Edgar BA. 2006. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* 124(2):267-273.
- Elias-Neto M, Soares MPM, Bitondi MMG. 2009. Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie* 40: 29-39.
- Elsik CG, Mackey AJ, Reese JT, Milshina NV, Roos DS, Weinstock GM. 2007. Creating a honey bee consensus gene set. *Genome Biology* 8(1): R13.
- Fahrbach SE. 2006. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annual Review of Entomology* 51: 209-232.
- Frasch M. 2008. A matter of timing: microRNA-controlled temporal identities in worms and flies. *Genes & Development* 22(12): 1572-1576.
- Fujita T, Kozuka-Hata H, Uno Y, Nishikori K, Morioka M, Oyama M, Kubo T. 2010. Functional analysis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) salivary system using proteomics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397(4): 740-744.
- Gilbert LI, Tata JR, Atkinson BG. (Eds.). 1996. Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. Academic Press, San Diego.
- Godlewski J, Wang S, Wilson TG. 2006. Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342: 1305-1311.

- Guo E, He Q, Liu S, Tian L, Sheng Z, Peng Q, Guan J, Shi M, Li K, Gilbert LI, Wang J, Cao Y, Li S. 2012. MET is required for the maximal action of 20-hydroxyecdysone during *Bombyx* metamorphosis. *PLoS One*. 7(12): e53256.
- Hepburn HR. 1985. Structure of the integument. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Oxford, Pergamon Press, 3: 1-58.
- Herranz H, Hong X, Cohen SM. 2012. Mutual repression by bantam miRNA and Capicua links the EGFR/MAPK and Hippo pathways in growth control. *Current Biology* 22: 651–657.
- Hinton HE. 1946. Concealed phases in the metamorphosis of insects. *Nature* 157: 552-553.
- Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. 2002. The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics* 161(4): 1527-1537.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 443(7114): 931-49.
- Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, Chung J, Kim VN. 2009. Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell* 139(6): 1096-108.
- Ikeya T, Galic M, Belawat P, Nairz K, Hafen E. 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current Biology* 12:1293–1300.
- Jagadeeswaran G, Zheng Y, Sumathipala N, Jiang H, Arrese EL, Soulages JL, Zhang W, Sunkar R. 2010. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics* 11: 52.
- Jenkin PM, Hinton HE. 1966. Apolysis in arthropod moulting cycles. *Nature* 211(5051): 871.
- Jiang J, Ge X, Li Z, Wang Y, Song Q, Stanley D.W, Tan A, Huang Y. 2013. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 43(8):692-700.
- Jin H, Kim VN, Hyun S. 2012. Conserved microRNA miR-8 controls body size in response to steroid signaling in *Drosophila*. *Genes & Development* 26(13): 1427-1432.
- Jindra M, Palli SR, Riddiford LM. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annual Review of Entomology* 58: 181-204.

- Kawamura K, Shibata T, Saget O, Peel D, Bryant PJ. 1999. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* 126(2): 211-219.
- Kayukawa T, Minakuchi C, Namiki T, Togawa T, Yoshiyama M, Kamimura M, Mita K, Imanishi S, Kiuchi M, Ishikawa Y, Shinoda T. 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of Krüppel homolog 1, a repressor of insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 109-129.
- Kennell JA, Cadigan KM, Shakhmantsir I, Waldron EJ. 2012. The microRNA miR-8 is a positive regulator of pigmentation and eclosion in *Drosophila*. *Developmental Dynamics* 241: 161-168.
- Konopova B, Jindra M. 2007. Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(25): 10488–10493.
- Konopova B, Smykal V, Jindra M. 2011. Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. *PLoS One*. 6(12): e28728.
- Kozlova T, Thummel CS. 2000. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology Metabolism* 11(7): 276-280.
- Ledent V, Vervoort M. 2001 The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Research* 11(5): 754-770.
- Leimar O, Hartfelder K, Laubichler MD, Page Jr RE. 2012. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees – a modeling approach. *Ecology and Evolution* 2(12): 3098-3109.
- Li ZQ, Cheng DJ, Wei L, Zhao P, Shu X, Tang L, Xiang ZH, Xia QY. 2010. The silkworm homolog of Methoprene-tolerant (Met) gene reveals sequence conservation but function divergence. *Insect Science* 17(4): 313-324.
- Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF. 2011. The participation of Calponin in the cross talk between 20-hydroxyecdysone and Juvenile Hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS One* 6(5): e19776.
- Liu S, Gao S, Zhang D, Yin J, Xiang Z, Xia Q. 2010. MicroRNAs show diverse and dynamic expression patterns in multiple tissues of *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 11: 85.
- Liu S, Xia Q, Zhao P, Cheng T, Hong K, Xiang Z. 2007. Characterization and expression patterns of let-7 microRNA in the silkworm (*Bombyx mori*). *BMC Developmental Biology* 7: 88.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP. 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*. 39: 372-85.

- Lozano J, Bellés X. 2011. Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific Reports* 1:163.
- Lucas K, Raikhel AS. 2013. Insect MicroRNAs: Biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 24-38.
- Michelette ERF, Soares AEE. 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 24: 431–440.
- Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T. 2009. Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology* 325: 341–350.
- Minakuchi C, Zhou X, Riddiford LM. 2008. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development* 125: 91–105.
- Moda LM, Vieira J, Guimarães Freire AC, Bonatti V, Bomtorin AD, Barchuk AR, Simões ZL. 2013. Nutritionally driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. *PLoS One*. 8(5): e64815.
- Nijhout HF, Davidowitz G, Roff DA. 2006. A quantitative analysis of the mechanism that controls body size in *Manduca sexta*. *J Biol.* 5(5): 16.
- Nijhout HF. 1994. *Insect Hormones*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Nijhout HF. 2003. The control of body size in insects. *Developmental Biology* 261(1): 1–9.
- Nolo R, Morrison CM, Tao C, Zhang X, Halder G. 2006. The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway. *Current Biology* 16: 1895–1904.
- Nosaka M, Ono A, Ishiwata A, Shimizu-Sato S, Ishimoto K, Noda Y, Sato Y. 2013. Expression of the rice microRNA miR820 is associated with epigenetic modifications at its own locus. *Genes and Genetic Systems* 88(2): 105-112.
- Nunes FMF, Ihle KE, Mutti NS, Simões ZLP, Amdam GV. 2013. The gene vitellogenin affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain. *Journal of Experimental Biology* 216(Pt 19): 3724-3732.
- Nunes FMF, Nascimento AM, Valente V, Espindola FS, Espreafico EM, Paçó-Larson ML, Silva Jr WA, Bitondi MMG, Hartfelder K, Simões ZLP. 2004b. Honey bee ESTs: developmental expression profiling and new insights into functional assignment for genome annotation. In: *Proceedings of the 8th International Conference on Tropical Bees, Ribeirão Preto – SP*, p. 143-149.
- Nunes FMF, Valente V, Sousa JF, Cunha MA, Pinheiro DG, Maia RM, Araujo DD, Costa MCR, Martins WK, Carvalho AF, Monesi N, Nascimento AM, Peixoto PM, Silva MF, Ramos RG, Reis LF, Dias-Neto E, Souza SJ, Simpson AJ, Zago MA, Soares AEE, Bitondi MMG, Espreafico EM, Espindola FS, Paçó-Larson ML, Simões ZLP, Hartfelder K, Silva WA Jr. 2004a. The use of Open Reading frame ESTs (ORESTES) for analysis of the honey bee transcriptome. *BMC Genomics* 5: 84.

- Page Jr RE, Peng CY. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* 36(4-6): 695–711.
- Parthasarathy R, Tan A, Palli SR. 2008. bHLH-PAS family transcription factor methoprene-tolerant plays a key role in JH action in preventing the premature development of adult structures during larval–pupal metamorphosis. *Mechanisms of Development* 125: 601–616.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 408(6808): 86-89.
- Pecasse F, Beck Y, Ruiz C, Richards G. 2000. Krüppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* 221: 53–67.
- Pourmirza AA. 2006. Toxicity of acetone to stored-product insects. *Journal of Agricultural Science and Technology* 8: 305-312.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403(6772):901-906.
- Rewitz KF, Yamanaka N, O'Connor MB. 2010. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Developmental Cell* 19(6): 895-902.
- Rewitz KF, Yamanaka N, O'Connor MB. 2013. Developmental checkpoints and feedback circuits time insect maturation. *Current Topics in Developmental Biology* 103: 1-33.
- Riddiford LM. 1993. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* 3(3): 203-9.
- Rubio M, de Horna A, Belles X. 2012. MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolan insect metamorphosis. *BMC Genomics*. 13: 386.
- Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R. 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: Growth and diabetic phenotypes. *Science* 296: 1118–1120
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 16(10): 944-945.
- Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yang L. 2004. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Research*. 32(4): e43.
- Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V. 2002. The expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 244(1): 170-179.
- Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V. 2003. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Developmental Biology* 259(1): 9-18.

- Shemshedini L, Wilson TG. 1990. Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(6): 2072–2076.
- Sláma K. 1980. Homeostatic function of ecdysteroids in ecdysis and oviposition. *Acta Entomology Bohemoslov* 73: 65–75.
- Soares MPM, Elias-Neto M, Simões ZLP, Bitondi MMG. 2007. A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 1272–1282.
- Tennessen JM, Thummel CS. 2008. Developmental timing: let-7 function conserved through evolution. *Current Biology* 18(16): 707-708.
- Thompson BJ, Cohen SM. 2006. The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell* 126(4):767-774.
- Thummel CS. 1995. From embryogenesis to metamorphosis: The regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* 83: 871–877.
- Truman JW. 2005. Hormonal control of insect ecdysis: Endocrine cascades for coordinating behavior with physiology. *Vitamins and Hormones* 73: 1–30.
- Tsuzuki S, Iwami M, Sakurai S. 2001. Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31(4-5): 321-331.
- Tunç I, Erler F, Dagli F, Çalis O. 1997. Insecticidal activity of acetone vapours. *J Stored Prod Res.* 33: 181-185.
- Wang HB, Sakudoh T, Kawasaki H, Iwanaga M, Araki K, Fujimoto H, Takada N, Iwano H, Tsuchida K. 2009. Purification and expression analysis of imaginal disc growth factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 55(11): 1065-1071.
- Wang S, Baumann A, Wilson TG. 2007. *Drosophila melanogaster* Methoprene-tolerant (Met) gene homologs from three mosquito species: Members of PAS transcriptional factor family. *Journal of Insect Physiology* 53(3): 246–253.
- Ward RE, Redi P, Bashirullah A, D'Avino PP, Thummel CS. 2003. GPF in living animals reveals dynamic development response to ecdysone during *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology* 256(2): 389-402.
- Wilson TG, Fabian J. 1986. A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Developmental Biology* 118(1): 190-201.
- Winston ML. 1993. The Honey Bee Colony: Life History. In *The Hive and the Honey Bee*. Ed. Graham, J.M., Dadant & Sons-Hamilton, Illinois, p. 73-95.
- Wolteji D, Fang Y, Han B, Feng M, Li R, Lu X, Li J. 2013. Proteome analysis of hemolymph changes during the larval to pupal development stages of honeybee workers (*Apis mellifera ligustica*). *Journal of Proteome Research* [Epub ahead of print, doi: 10.1021/pr400519d].
- Woodard CT, Baehrecke EH, Thummel CS. 1994. A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* 79: 607–615.

- Yamada M, Murata T, Hirose S, Lavorgna G, Suzuki E, Ueda H. 2000. Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 127(23): 5083-5092.
- Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB. 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annual Review of Entomology* 58: 497-516.
- Zhu J, Chen L, Sun G, Raikhel AS. 2006. The competence factor  $\beta$ Ftz-F1 potentiates ecdysone receptor activity via recruiting a p160/SRC coactivator. *Molecular and Cellular Biology* 26: 9402–9412.
- Zitnan D, Adams ME. 2005. Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In: *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology, Pharmacology, and Molecular Biology*, (L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill, Eds.), Elsevier Press, London, Vol. 3, p. 1-60.



Este trabalho foi realizado com recursos de um Projeto Temático (Processo no. 2011/03171 -5) e uma bolsa de Iniciação Científica (Processo no. 2011/21731-8), ambos financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.