

**Ministério da Educação
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG**

ANNA CLÁUDIA GUIMARÃES FREIRE

**O código transcricional gerado pelo cérebro sob influência de
diferenciais dietários durante o desenvolvimento do sistema
nervoso de *Apis mellifera***

Alfenas/MG
2012

ANNA CLÁUDIA GUIMARÃES FREIRE

**O código transcricional gerado pelo cérebro sob influência de
diferenciais dietários durante o desenvolvimento do sistema
nervoso de *Apis mellifera***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk.

Alfenas/MG
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Freire, Anna Cláudia Guimarães .
F866c O código transcricional gerado pelo cérebro sob influência de
diferenciais dietários durante o desenvolvimento do sistema nervoso de *Apis
mellifera* / Anna Cláudia Guimarães Freire. -- Alfenas/MG, 2012.
96 f.: il. --

Orientador: Angel Roberto Barchuk.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade
Federal de Alfenas, 2012.
Bibliografia.

1. Neurogênese. 2. Expressão gênica. 3. Alimentação diferencial. 4.
Abelhas. I. Barchuk, Angel Roberto . II. Título.

CDD- 612.82

ANNA CLÁUDIA GUIMARÃES FREIRE

**O código transcricional gerado pelo cérebro sob influência de
diferenciais dietários durante o desenvolvimento do sistema
nervoso de *Apis mellifera***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk.

Aprovada em: ____/____/____

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Aos meus pais, Joselito e Maria Tereza,
Ao meu irmão Marco Túlio...
Aos meus avós, Dagoberto e Tereza,
Israel (*in memoriam*) e Maria...
À minha bisavó Guiomar (*in memoriam*)...
Ao meu namorado Anderson...
...Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade, confiança, crescimento, força e amparo inexplicável.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio inquestionável, esforços imensuráveis e por me proporcionarem o melhor, em todos os momentos.

Ao meu irmão, Marco Túlio G. Freire, pela amizade, força, risos e por me fazer querer ser sempre um bom exemplo.

Aos meus avós, pelas orações, carinho, torcida, afeto e disposição de sempre.

Ao Anderson Belo Fernandes pelo amor, inspiração, companheirismo, apoio, paciência de sempre e socorro nos momentos de desespero.

À minha grande amiga de Alfenas, Mariny F. C. Coelho, pela companhia, pelas palavras doces, pela confiança e pelo carinho.

À Joseana Vieira, pelo apoio imensurável, força, amizade dentro e fora do laboratório, brincadeiras e conselhos.

À minha amiga Alessandra Silva, pela amizade, companhia e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, pela oportunidade, confiança, orientação, ensinamentos, dedicação e bom humor.

A todos os colegas do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF), em especial ao Bruno Zavan, ao Daniel A. de Almeida Galdino, à Aline S. Teixeira, à Kamila L. Rodrigues e à Erika P. Tavares, pela amizade, pelo apoio e pela torcida.

Aos colegas de laboratório Aline Volmero, Heloísa Gianelli, Márcio Tadeu de Oliveira e Marina Yukari, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos, professores e demais funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) pela amizade, apoio e bons momentos.

Aos amigos Prof. Dr. Marcos José Marques e Vilma Marques da Silva pela amizade desde o início, pelo apoio em todos os momentos e pelo carinho.

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade, suporte e experiência de vida.

Ao PMPGCF, pela iniciativa de inovar o ensino e a prática de Ciências Fisiológicas, promovendo a união de excelentes universidades e possibilitando valiosas experiências de vida.

Ao Coordenador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pela dedicação na implementação do PMPGCF na UNIFAL-MG e pelo incentivo ao desenvolvimento científico.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cumpri durante o mestrado, dentro ou fora da UNIFAL-MG.

À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões e à Dra. Livia Maria Rossato Moda, Ana Durvalina Bontorim, Vanessa Bonatti e todo o Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – *campus* Ribeirão Preto pelas colaborações e ensinamentos.

A CAPES pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que, a pesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

A diferenciação morfofisiológica observada entre as fêmeas *Apis mellifera* é decorrente dos diferentes regimes alimentares experimentados durante o período larval. Os diferenciais dietários desencadeiam complexas cascatas de reações endócrinas, conduzindo ao estabelecimento de diferentes redes de expressão gênica. O resultado é a diferenciação de castas, rainhas e operárias, a partir de genótipos aparentemente idênticos. O tamanho do cérebro em relação ao do corpo representa uma das principais diferenças fenotípicas entre rainhas e operárias. Operárias adultas apresentam o cérebro proporcionalmente mais desenvolvido em relação às rainhas. Entretanto, o inverso é observado durante o desenvolvimento larval, período no qual as rainhas apresentam cérebros maiores, provavelmente, em resposta ao diferencial nutricional. Assim, nosso objetivo foi identificar mediadores moleculares que respondem ao diferencial alimentar, conduzindo ao maior desenvolvimento do cérebro em rainhas durante o período larval. Para tanto, foram dissecados cérebros de larvas de rainhas e operárias. O RNA total dos cérebros foi utilizado para a síntese de cDNA, a partir do qual foi sintetizado aRNA marcado com fluoróforos diferenciados. Este foi hibridado em lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos correspondentes a todos os genes conhecidos do genoma de *A. mellifera*. Após a obtenção e quantificação das imagens de hibridação, os transcritos diferencialmente representados (TDR) foram selecionados através de normalização e análises estatísticas sendo, então, analisados *in silico*. As análises mostraram 16 TDRs entre o cérebro das castas, sendo que 12 são mais abundantes em rainhas e quatro, em operárias. Os produtos dos transcritos mais representados nas primeiras estão relacionados à proliferação, fasciculação e conexão neural. Em operárias, os produtos dos genes mais transcritos atuam, principalmente, no desenvolvimento de células dos olhos e de neurônios GABAérgicos. PCRq do gene *GlcAT-P* (um TDR) mostrou que seus níveis de transcrição são maiores em cérebro de rainhas durante todo o período de desenvolvimento larval estudado (L3-L5), corroborando, assim, os dados dos *microarrays*. Os produtos codificados pelos TDR encontrados neste trabalho, atuando juntos, podem ser responsáveis por mediar a ação nutricional sobre a morfogênese do cérebro em castas *A. mellifera*.

Palavras-chave: Neurogênese. Expressão gênica. Alimentação diferencial.
Abelhas.

ABSTRACT

The morphophysiological differentiation observed among *Apis mellifera* females is due to the different diets experienced during the larval period, which trigger complex cascades of endocrine reactions, leading to the establishment of different gene expression networks, thus giving rise to two very different morphs, queens and workers, from seemingly identical genotypes. The brain area/body size ratio represents a major phenotypic difference between queens and workers. Adult workers have proportionally more developed brains than queens. However, the opposite is observed during the larval period, in which queens have larger brains, probably in response to differential nutrition. Thus, our objective was to identify molecular mediators responding to the larval differential feeding, leading to the more developed brain of queens. Larval brains were dissected, and their total RNAs were used for cDNA synthesis, from which was synthesized aRNA marked with different fluorophores. These labeled RNAs were hybridized to oligonucleotide microarray slides corresponding to all known genes of the *A. mellifera* genome. After obtaining images and quantification of hybridization, the differentially represented transcripts (DRT) were selected through normalization and statistical analyzes, and studied *in silico*. There were found 16 DRT in the brain of *A. mellifera* queens and workers at L4, 12 up-regulated in queens and 4 in workers. Considering predicted functions, or demonstrated in other biological systems, the up-regulated transcript products in queens are associated with cell proliferation, fasciculation and interneuronal connections processes. In workers, the over-represented gene products act mainly on the eye cells and GABAergic neurons development, thus allowing adult activities like navigation, foraging, and nestmate recognition. qPCR of the gene *GlcAT-P* (a DRT) showed that its transcription levels are higher in queens' brain during the whole larval period (L3-L5), thus confirming *microarray* results. The products encoded by the DRTs found in this work, acting together, may be responsible for mediating the nutritional influence on brain morphogenesis in *A. mellifera* castes.

Keywords: Neurogenesis. Gene expression. Differential feeding. Honeybees.

“Não é digno de saborear o mel, aquele que se afasta da colmeia por medo das picadas das abelhas.”

W. Shakespeare

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo geral da diferenciação de castas em <i>Apis mellifera</i>	22
Figura 2 - Desenho esquemático dos três principais compartimentos do cérebro de <i>A. mellifera</i> . Fonte: SCHEINER, R.; BAUMANN, A.; BLENAU, W., 2006..	25
Figura 3 - Cérebro de operária e rainha <i>A. mellifera</i> durante o quinto estágio do desenvolvimento larval.	26
Figura 4 - Fluxo experimental.....	30
Figura 5 - Procedimento adotado para a obtenção das larvas	32
Figura 6 - Gráficos plotados a partir da análise da hibridação de lâminas de <i>microarrays</i> contendo sequências representativas de todo o genoma de <i>A. mellifera</i> com amostras do cérebro de rainhas e operárias em L4.....	42
Figura 7 - Organização do gene GB11706 de <i>A. mellifera</i>	44
Figura 8 - Organização da proteína correspondente ao GB11706.....	44
Figura 9 - Organização do gene GB12021 de <i>A. mellifera</i>	45
Figura 10 - Organização da proteína correspondente ao GB12021.....	45
Figura 11 - Organização do gene GB12545 de <i>A. mellifera</i>	45
Figura 12 - Organização da proteína correspondente ao GB12545.....	46
Figura 13 - Organização do gene GB12545 de <i>A. mellifera</i>	46
Figura 14 - Organização da proteína correspondente ao GB12549.....	46
Figura 15 - Organização do gene GB12549 de <i>A. mellifera</i>	47
Figura 16 - Organização da proteína correspondente ao GB15759.....	47
Figura 17 - Organização do gene GB18982 de <i>A. mellifera</i>	48
Figura 18 - Organização da proteína correspondente ao GB18982.....	48
Figura 19 - Organização do gene GB18914 de <i>A. mellifera</i>	48
Figura 20 - Organização da proteína correspondente ao GB18914.....	49
Figura 21 - Organização da proteína correspondente ao GB18914.....	49

Figura 22 - Organização do gene GB19686 de <i>A. mellifera</i>	49
Figura 23 - Organização do gene GB19966 de <i>A. mellifera</i>	50
Figura 24 - Organização da proteína correspondente ao GB19966.....	50
Figura 25 - Organização do gene GB10931 de <i>A. mellifera</i>	51
Figura 26 - Organização da proteína correspondente ao GB10931.....	52
Figura 27 - Organização do gene GB11875 de <i>A. mellifera</i>	52
Figura 28 - Organização do gene GB16661 de <i>A. mellifera</i>	53
Figura 29 - Organização da proteína correspondente ao GB16661.....	53
Figura 30 - Gráfico representando os valores obtidos por PCRq em Tempo Real....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de operárias de abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas (Michelette e Soares 1993)	33
Tabela 2 - Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de rainhas de abelhas europeias, <i>Apis mellifera carnica</i> (modificado de Rembold et al., 1980).....	34
Tabela 3 - <i>Primers</i> desenhados para a amplificação dos TDRs de interesse	39
Tabela 4 - Características de genes mais transcritos no cérebro de rainhas em relação ao de operárias <i>A. mellifera</i> no quarto estágio larval.....	43
Tabela 5 - Características de genes mais transcritos no cérebro de operárias em relação ao de rainhas <i>A. mellifera</i> no quarto estágio larval.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Ambiente e neurogênese.....	16
1.2	Invertebrados como modelos de estudo da neurogênese	19
1.3	Biologia das abelhas <i>Apis mellifera</i>	20
1.4	Diferenciação de castas <i>A. mellifera</i>	21
1.5	O sistema nervoso e a neurogênese de <i>A. mellifera</i>	23
1.6	Quais são os genes que ligam alimentação ao desenvolvimento diferencial do cérebro de larvas em castas de <i>A. mellifera</i> ?.....	27
2	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Visão geral.....	30
3.2	Obtenção de abelhas e cérebros.....	31
3.3	Obtenção de RNA total	35
3.4	Hibridação das lâminas de <i>microarray</i>	35
3.5	Bioinformática	37
3.6	Determinação dos perfis de transcrição de <i>GlcAT-P</i> mediante PCR quantitativa em tempo real	38
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Transcritos diferencialmente representados entre o cérebro de rainhas e operárias durante L4	41
4.1.1	<i>Transcritos super-representados em cérebro de rainhas</i>	43
4.1.2	<i>Transcritos super-representados em cérebro de operárias</i>	50

4.1.3	<i>Transcritos diferencialmente representados sem número de acesso em bases de dados</i>	53
4.2	Perfil de transcrição de GlcAT-P em cérebro de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval	53
5	DISCUSSÃO	55
5.1	Sobre os transcritos mais representados no cérebro de rainhas em L4	55
5.2	Sobre GlcAT-P e sua transcrição diferencial em cérebro de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval	63
5.3	Sobre os transcritos mais representados no cérebro de operárias em L4	65
5.4	Sobre os transcritos diferencialmente representados sem número de acesso em bases de dados	70
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ambiente e neurogênese

Por muito tempo pensou-se que a perda de neurônios em cérebros de mamíferos adultos era irreversível, partindo-se da hipótese de que tecidos nervosos adultos não proliferam. Trabalhos publicados durante a última década demonstraram, porém, que os cérebros de camundongos, macacos e, inclusive, do homem, possuem células proliferativas que migram, se diferenciam, estendem axônios e expressam proteínas marcadoras de células nervosas (ERIKSSON et al., 1998; GAGE, 2000). Genes associados à neurogênese adulta foram identificados mediante abordagens genômicas em vários vertebrados, particularmente em camundongos e ratos (GETCHELL et al., 2005; KEMPERMANN et al., 2006; LOUA et al., 2008; WU et al., 2009).

A dominância social, os ambientes favoráveis e a restrição de dieta são estímulos externos que induzem as células tronco nervosas do cérebro de camundongos adultos, e até mesmo de alguns insetos, como o grilo, a produzirem novas células nervosas (WU et al., 2009; CAYRE et al., 2007). Este fenômeno parece ser mediado, em alguns casos, pela produção de neurotrofinas, e, em outros, pelo aumento da sobrevivência celular (LEE et al., 2002; NILSSON et al., 1999; LEE et al., 2002; KOZOROVITSKIY; GOULD, 2004). O exercício voluntário, todavia, induz o aumento da proliferação e da diferenciação das células e, ainda, o aumento da sobrevivência, resultando em neta neurogênese (VAN PRAAG et al., 1999; LOUA et al., 2008).

Estudos têm demonstrando a influência da dieta sobre o processo de neurogênese em adultos do ponto de vista molecular. Pesquisas sugerem fortemente que dietas com alto teor de gordura apresentam um papel importante no desenvolvimento de desordens neurodegenerativas. Mateos et al. (2005) identificaram 37 genes diferencialmente transcritos entre o cérebro de camundongos tratados com dieta com alto teor de gordura em relação a camundongos controles. Destes, genes codificadores de moléculas relacionadas à doença de Alzheimer foram regulados positivamente no grupo tratado. O gene para a proteína associada ao citoesqueleto, Arc, relacionada à plasticidade sináptica, foi regulado negativamente no mesmo grupo.

Lee et al. (2010) estudaram a influência de dietas contendo alto teor de gordura sobre a transcrição gênica no hipotálamo de camundongos. Dentre os transcritos diferencialmente representados, cinco sequências codificadoras de moléculas relacionadas à síntese e liberação de dopamina, um crítico neurotransmissor relacionado à sensação de prazer, foram reguladas positivamente no grupo tratamento em relação a animais que receberam dieta controle. O desequilíbrio nas concentrações de diferentes neurotransmissores, dentre eles a dopamina, em regiões do cérebro relacionadas às atividades emocionais, tem sido proposto com a base neurológica da doença de Alzheimer (LANARI et al., 2006).

A deficiência crônica de vitamina E também é apontada como um dos fatores responsáveis por síndromes neurológicas características, as quais podem ser acompanhadas por anormalidades eletrofisiológicas da função neural e visual (HAYTON; MULLER, 2004). Hyland et al. (2005) encontram 45 genes diferencialmente transcritos entre córtex cerebral de animais tratados com dieta pobre em vitamina E em relação ao grupo controle. Dentre estes, genes codificadoras de componentes proteicos da mielina e de determinantes da propagação do sinal neural foram regulados negativamente no primeiro grupo.

A geleia real, substância secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares de operárias adultas jovens (PIERRE, 1981), é conhecida por suas atividades biológicas em vários tipos de células e tecidos de modelos animais. Hashimoto et al. (2005) demonstraram que a administração oral de geleia real regula positivamente a transcrição do mRNA do fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), um potente fator neurotrófico do cérebro, e do neurofilamento H, marcador específico predominantemente encontrado em axônios, no hipocampo de camundongos adultos.

Durante o desenvolvimento do cérebro, os nutrientes provenientes da dieta também podem interferir no processo de neurogênese. Dietas deficientes ou desbalanceadas em nutrientes essenciais durante estágios críticos do desenvolvimento podem alterar o desenvolvimento normal do cérebro, além de surtirem efeitos de longa duração e potencialmente irreversíveis na função neural, independentemente da adoção tardia de uma dieta adequada (DOBBING, 1971). No início do desenvolvimento de humanos, a privação de comida por um longo prazo pode aumentar as chances de se desenvolver diabetes e obesidade na vida

adulta (RAVELLI et al., 1976; RAVELLI et al., 1998). Outros trabalhos estabeleceram associações fortes entre dieta pobre em proteínas durante as primeiras semanas de vida e alterações estruturais e comportamentais de ratos (RUDY; CASTRO, 1990; FUKUDA et al., 2002).

A influência de hormônios na neurogênese, especialmente esteroides, e do ácido siálico, também já foi demonstrada (SCHLINGER et al., 2001; LONDON et al., 2009; WANG, 2009). Além disso, não parecem existir dúvidas sobre a importância de certos micronutrientes, pelo menos do ácido fólico e do ferro, no desenvolvimento do cérebro e da cognição em mamíferos (BENTON, 2010).

O ácido docosahexaenóico, um ácido graxo essencial do tipo ω -3, encontra-se enriquecido nas membranas de células do cérebro, sendo essencial para a função cerebral e sintetizado em grandes quantidades durante a neurogênese de mamíferos, principalmente durante o desenvolvimento fetal e neonatal (INNIS, 2003; MARTINEZ, 1992). Uma vez que as células dos mamíferos não apresentam enzimas que sintetizam ácidos graxos do tipo ω -3, todo o ácido docosahexaenóico do cérebro deve ser derivado do ω -3 proveniente da dieta. Bertrand et al. (2006) mostraram alterações no desenvolvimento do cérebro de ratos que receberam uma dieta deficiente em ω -3 (ver também INNIS, 2007). Trabalhos semelhantes realizados com aves mostraram resultados equivalentes (ANDERSON et al., 1999).

O ácido 10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA), principal componente da fração lipídica da geleia real, estimula a diferenciação de células tronco neurais em neurônios, um fenômeno também observado usando butirato de sódio e ácido valpróico (HATTORI et al., 2007; YAO et al., 2010; YU et al., 2009). Em mamíferos, o 10-HDA pode reativar a expressão de genes silenciados epigeneticamente (DOLINOY et al., 2007). Spannhoff et al. (2011) constataram que o 10-HDA apresenta atividade inibitória de histonas desacetilases. Tal atividade nos leva a especular que o 10-HDA esteja envolvido na regulação epigenética do desenvolvimento diferencial de castas em *A. mellifera*, particularmente do cérebro.

Apesar da realização dos estudos anteriormente citados, pouco se conhece sobre a influência da dieta sobre padrões de transcrição gênica que conduzem a alterações durante o desenvolvimento do cérebro. Um dos poucos trabalhos publicados vinculados tangencialmente neste sentido refere-se aos efeitos tóxicos

da ingestão de metil-mercúrio sobre a expressão gênica no desenvolvimento do cérebro com consequências comportamentais (GLOVER et al., 2009). Vários trabalhos mostram estes fenômenos focalizando-se em um ou poucos genes, como o caso da regulação positiva da transcrição do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) em tecidos musculares e no fígado e a não alteração de sua expressão em cérebros de aves (MATSUMURA et al., 1996).

Disto, desprende-se que os processos envolvidos na influência nutricional sob o desenvolvimento do cérebro, fundamentalmente em relação aos mecanismos moleculares que medeiam este processo, são ainda desconhecidos e necessitam ser desvelados.

1.2 Invertebrados como modelos de estudo da neurogênese

O entendimento acerca do desenvolvimento do sistema nervoso e da biologia das células-tronco neurais progrediu rapidamente na última década. Boa parte deste progresso é proveniente de estudos com modelos de invertebrados como, por exemplo, *Drosophila melanogaster*. Além disso, a conservação de aspectos cruciais da genética do desenvolvimento neural entre as espécies tem despertado a atenção especial dos pesquisadores. Achados recentes enfatizaram a alta homologia entre regiões do prosencéfalo de espécies bastante distintas, como anelídeos e humanos. Tomer et al. (2010) mostraram que os corpos cogumelares do anelídeo *Platynereis dumerilii* compartilham um *fingerprint* molecular com o córtex de mamíferos em desenvolvimento.

Até recentemente, a ideia principal era de que as células-tronco neurais de *Drosophila* eram muito diferentes daquelas encontradas no neuroepitélio do sistema nervoso central de vertebrados, incluindo o córtex cerebral. Entretanto, foram identificadas similaridades entre a composição e a organização do neuroepitélio do lobo óptico de *Drosophila* e o do córtex cerebral de mamíferos. Além destas, semelhanças também são notadas entre o padrão de divisão e as linhagens de diferenciação de células tronco neurais de insetos e mamíferos (BRAND; LIVESEY, 2011).

Dados os achados recentes sobre as similaridades entre o sistema nervoso e a biologia dos precursores neurais de insetos e mamíferos, torna-se

interessante explorar se esta conservação se estende também aos mecanismos celulares e moleculares que regulam a auto-renovação, a proliferação e o destino das células.

1.3 Biologia das abelhas *A. mellifera*

A abelha *Apis mellifera* Linneus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) é considerada um dos mais interessantes modelos de estudo em Biologia, principalmente por ser um inseto eussocial, possuir memória bem desenvolvida e uma alta capacidade de aprendizado, além de um sistema de orientação espacial sofisticado (ZARS et al., 2000; PASCUAL; PRÉAT, 2001).

As abelhas são insetos holometábolos, uma vez que apresentam metamorfose completa. Após o período embrionário, ocorre a eclosão das larvas, as quais passam por quatro mudas. Estas mudas designam cinco estágios larvais (L1 a L5), sendo estes caracterizados por intensa alimentação e crescimento. Após o período larval, a ontogênese prossegue com uma muda metamórfica, dando início ao período pupal, quando os indivíduos não se alimentam e ocorre a substituição dos tecidos larvais por tecidos adultos. Na fase adulta, as abelhas desempenham funções específicas, havendo sobreposição de gerações, cuidado cooperativo da prole e divisão do trabalho reprodutivo, características das organizações eussociais (WILSON, 1971).

O sistema de determinação do sexo em *A. mellifera* é haplo-diplóide, ou seja, ovos não fertilizados, portanto, haploides ($n=16$), originam machos. Os ovos diploides ($2n=32$), ou seja, fertilizados, dão origem às fêmeas (WINSTON, 1987). Apenas um tipo de macho é observado na colônia, sendo denominado zangão, cuja única função é fecundar a rainha durante o voo nupcial. As larvas fêmeas se diferenciam em castas, operárias ou rainhas, dependendo do tipo de dieta que recebem (BEETSMA, 1979). As rainhas, morfofisiologicamente adaptadas para a reprodução, são maiores e apresentam longevidade consideravelmente maior em relação às operárias. Estas, por sua vez, são especializadas em executar tarefas relacionadas à manutenção da colônia (WHELLER, 1986; PAGE; PENG, 2001).

As larvas que originarão operárias desenvolvem-se em células menores na colmeia, e aquelas que irão tornar-se rainhas, em células modificadas, maiores, denominadas realeiras. Até o terceiro estágio larval (L3), todas as fêmeas são

alimentadas com geleia real, como já mencionado, é secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares de operárias adultas jovens (PIERRE, 1981). A partir de L3, o regime alimentar passa a ser casta-específico. As larvas que originarão rainhas continuam recebendo tal alimento, enquanto as futuras operárias passam a receber uma mistura de geleia real, mel e pólen, denominada “geleia de operária” (MICHENER, 1969). A geleia real difere da “geleia de operária” pela quantidade de secreção de cada glândula das operárias, afetando sua composição. O teor de carboidratos da geleia real é quatro vezes maior do que o oferecido às larvas de operárias. Contudo a razão glicose:frutose é praticamente a mesma nas duas secreções (ASENCOT; LENSKY, 1988). A geleia real é um alimento rico em carboidratos, vitaminas do complexo B, minerais, proteínas, lipídios e sais minerais (BENITEZ, 2000).

Apesar de não estar claro como a informação trófica diferencial é decifrada pelo organismo, sabe-se que a geleia real desencadeia uma série de reações neuroendócrinas específicas. Dentre estas, é observado o aumento da síntese de Hormônio Juvenil (HJ) pelos *corpora allata* (CA), um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral (NIJHOUT; WHEELER, 1982; WHEELER, 1986; RACHINSKY; HARTFELDER, 1990; HARTFELDER; ENGELS, 1998). Sob níveis desiguais de HJ, as larvas que originarão cada casta seguem linhas distintas de desenvolvimento. Em *A. mellifera*, isto é mais evidente entre o terceiro e o início do quinto estágio larval, estágios estes caracterizados por títulos de HJ mais altos em rainhas do que em operárias (RACHINSKY et al., 1990; HARTFELDER; ENGELS, 1998).

1.4 Diferenciação de castas *Apis mellifera*

A disponibilidade da sequência completa do genoma de *Apis mellifera* (WEINSTOCK et al. 2006) gerou novas possibilidades para o entendimento do desenvolvimento diferencial das castas de *A. mellifera* e das características morfofisiológicas e comportamentais que as distinguem (CRISTINO et al., 2006).

A partir de resultados de análise da expressão gênica diferencial durante o período crítico do desenvolvimento de operárias e rainhas, obtidos mediante *microarrays* de cDNA, Barchuk et al. (2007) propuseram o primeiro modelo para a diferenciação de castas em *A. mellifera* (Figura 1). Neste, a informação

nutricional é reconhecida pelo sistema nervoso estomatogástrico da larva e transmitida ao cérebro e ao sistema endócrino, regulando a atividade dos CA e o comportamento dos tecidos alvos através de moléculas da via insulina/IGF, eventualmente, secretadas pelas células neurosecretoras do cérebro larval (BOLELI et al., 1998; WHEELER et al., 2006).

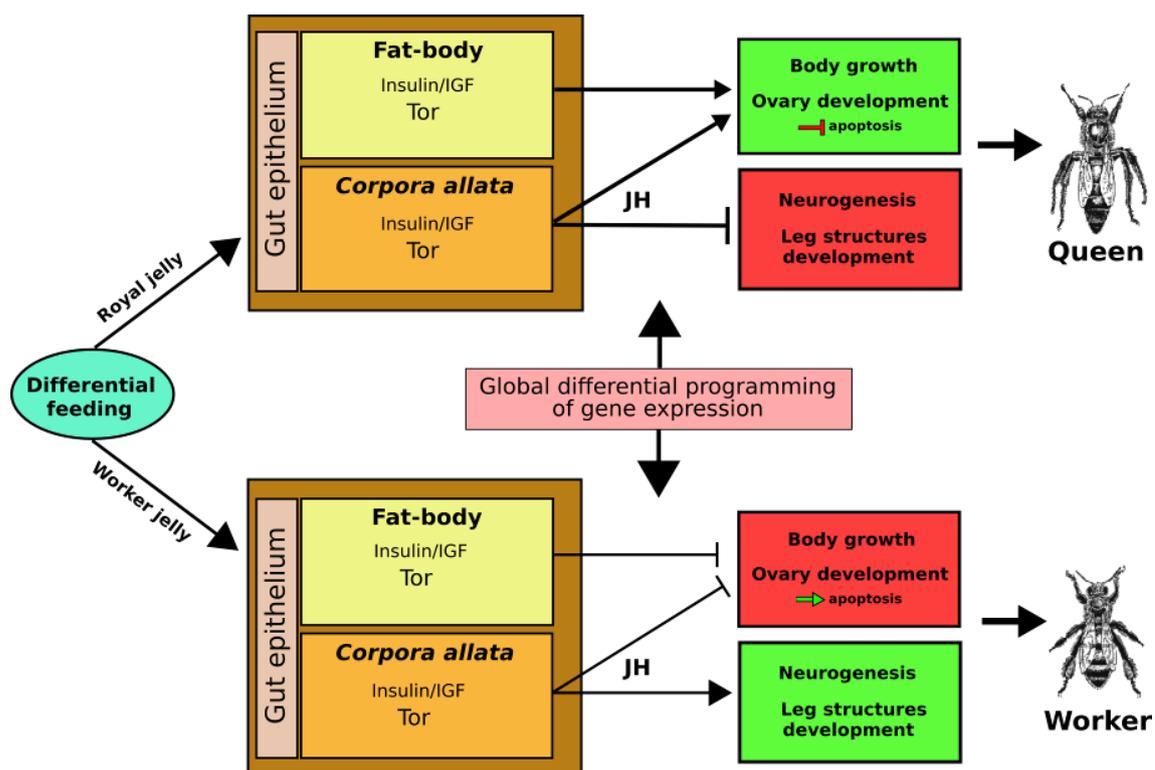


Figura 1 - Modelo geral da diferenciação de castas em *Apis mellifera*. A espessura da flecha indica o nível de ação relativa ao fator considerado
 Fonte: BARCHUK et al., 2007.

Outro órgão sensível ao HJ, o corpo gorduroso, recebe a informação do estado nutricional através da hemolinfa. Em futuras rainhas, mediante a ação promotora da geleia real, esta via resulta em altos níveis de ativação dos sistemas insulina/IGF e TOR, o que também aumenta os níveis de síntese de HJ nos *corpora allata*, e pode disparar o caminho de comunicação sistêmica mediada por ALS no corpo gorduroso. A “geleia de operária”, por outro lado, afeta a via insulina/IGF de uma maneira menos pronunciada e pode não ser capaz de aumentar os níveis de HJ acima de um limiar específico (BARCHUK et al., 2007).

Como resultado dos altos títulos de HJ em rainhas, a expressão de genes fisiometabólicos é regulada positivamente e, em conjunto com os nutrientes

provenientes da geleia real, determinam o padrão de crescimento corporal. Neste modelo, a regulação positiva de *tor* em larvas de rainhas pode ser vista como um determinante da taxa de crescimento diferencial (BARCHUK et al., 2007; PATEL et al., 2007).

O HJ parece atuar determinando dois tipos de alterações no padrão de desenvolvimento: alterações de aquisição, que determinam um maior crescimento corporal da larva ou de campos específicos, especialmente dos ovários, e alterações de perda de estruturas específicas, como o órgão coletor de pólen e as glândulas de cera (BARCHUK et al., 2007). Além disso, o HJ é, provavelmente, o controlador da expansão do desenvolvimento neural, especificamente dos corpos cogumelares, resultando em um cérebro proporcionalmente maior em operárias quando comparado ao de rainhas na fase adulta (MICHENER, 1974). A aquisição de um cérebro mais desenvolvido permite às operárias realizar tarefas mais diversificadas ao longo da vida adulta como, por exemplo, o forrageamento, o cuidado com as crias e o patrulhamento da colônia.

Os títulos de HJ parecem ser regulados pela ativação da via do EGFR, como reportado por Kamakura (2011). Este autor demonstrou que uma proteína presente na geleia real, designada como “royalactina” (57 kDa), é uma das responsáveis por induzir a diferenciação de larvas de abelhas melíferas em rainhas. Esta proteína ativa a quinase p70, a qual é responsável pelo aumento do tamanho do corpo e da atividade da proteína quinase ativada por mitógenos, estando envolvida na redução do tempo de desenvolvimento e no aumento dos títulos de HJ.

1.5 O sistema nervoso e a neurogênese de *A. mellifera*

A capacidade de tirar proveito de suas próprias experiências é frequentemente considerada um componente da inteligência, sendo associada a comportamentos complexos em animais como, por exemplo, voar, forragear e reconhecer parentes (FAHRBACH, 2006). Dentre as espécies que não possuem neurogênese adulta (FAHRBACH et al., 1995), as abelhas são insetos com um sofisticado sistema de orientação espacial, apresentando memória e capacidade de aprendizado bem desenvolvidos, sendo estas características associadas às estruturas cerebrais (ZARS et al., 2000; PASCUAL; PRÉAT, 2001).

Em embriões de insetos, o cérebro é diferenciado a partir da ectoderme da cabeça embrionária, e os gânglios corporais são gerados a partir do cume da neuro-ectoderme (SNODGRASS, 1984). O sistema nervoso das abelhas é formado por um cérebro, que se localiza acima do gânglio subesofágico, e um longo cordão nervoso ventral com três gânglios no tórax e oito no abdômen, todos unidos (NIVEN et al., 2008).

O cérebro de *A. mellifera* consiste em três regiões principais: o deutocérebro, o tritocérebro e o protocérebro (Figura 2). O deutocérebro abriga os lóbulos dorsais e os antenais, os quais contêm, aproximadamente, 160 glomérulos e recebem informações sensoriais dos receptores olfativos das antenas. A partir dos lobos dorsais, principalmente, são projetadas as fibras mecanossensoriais (SUZUKI, 1975; SNODGRASS, 1984). O tritocérebro é composto por dois lóbulos bilaterais, relativamente pequenos, na base do cérebro. Tais lóbulos são conhecidos por terem conexões sensoriais e motoras com a boca e o trato digestivo, estando adjacentes ao gânglio subesofágico, um relé entre o cérebro e o cordão nervoso ventral (MOBBS, 1982).

O protocérebro contém os lóbulos ópticos, o complexo central e um par de corpos cogumelares. Os lóbulos ópticos recebem e processam informação sensorial a partir dos olhos compostos. O complexo central conecta e coordena a informação de ambos os hemisférios cerebrais e está supostamente envolvido no controle motor. Ele compreende um grupo de neurópilas no centro do cérebro, sendo formado pela ponte protocerebral e o corpo central. O corpo central, por sua vez, é subdividido em superior, inferior e um par de nódulos (STRAUSS, 2002).

Os corpos cogumelares são estruturas pares, localizadas simetricamente em cada lado do protocérebro e descritas como sendo o centro da base neural para processamento e armazenamento da informação olfatória (DAVIS, 2001; GERBER et al., 2004), estando também envolvidas em outras formas de aprendizado (LIU et al., 1999; MIZUNAMI et al., 1993). Cada corpo cogumelar consiste em um par de cálices (médio e lateral), dois lóbulos (α e β) e um pedúnculo. Os cálices, conectados aos lóbulos pelo pedúnculo (SCHEINE et al., 2006), são divididos em três subcompartimentos, denominados lábio, colar e anel basal, os quais recebem impulsos sensoriais processados das regiões óptica e olfatória do cérebro e impulsos mecanossensoriais da cabeça (Figura 3).

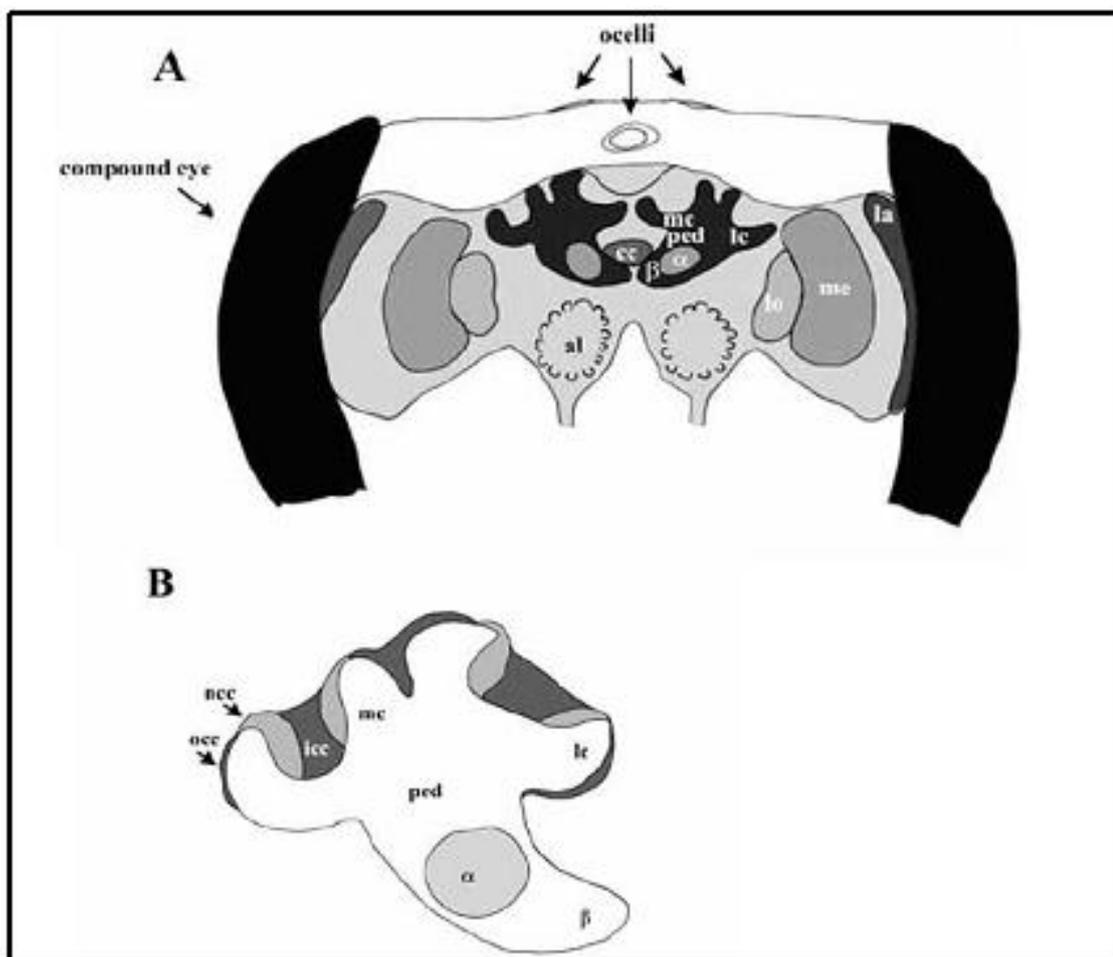


Figura 2 - Desenho esquemático dos três principais compartimentos do cérebro de *A. mellifera*. O protocérebro contém os lóbulos ópticos, a lâmina (la), a medula e o lóbulo (lo), um par de corpos cogumelares (mb) e o complexo central (cc). Cada corpo cogumelar consiste em um cálice lateral (lc) e um cálice mediano (mc), os quais são conectados aos lóbulos α (α) e β (β) pelo pedúnculo (ped). O lóbulo antenal (al) é parte do deutocérebro, o qual contém o lobo dorsal (não mostrado). O tritocérebro (não mostrado) é composto por dois pequenos lóbulos laterais na base do cérebro. B) Desenho esquemático do corpo cogumelar com três subpopulações de células Kenyon: células externas compactas (occ), células não compactas (ncc) e células internas compactas (icc).

Fonte: SCHEINER, R.; BAUMANN, A.; BLENAU, W., 2006.

A estrutura dos corpos cogumelares é primeiramente determinada pela morfologia das células Kenyon, que são os neurônios internos dos corpos cogumelares (KENYON, 1896; MOBBS, 1982). Em *A. mellifera*, três tipos de células Kenyon podem ser facilmente identificadas, de acordo com o tamanho e localização de seus corpos celulares (MOBBS, 1982). Cada uma dessas

subpopulações é gerada em períodos distintos do desenvolvimento dos corpos cogumelares (FARRIS; SINAKEVITCH, 2003; MODA et al., em prep., Fig. 3).

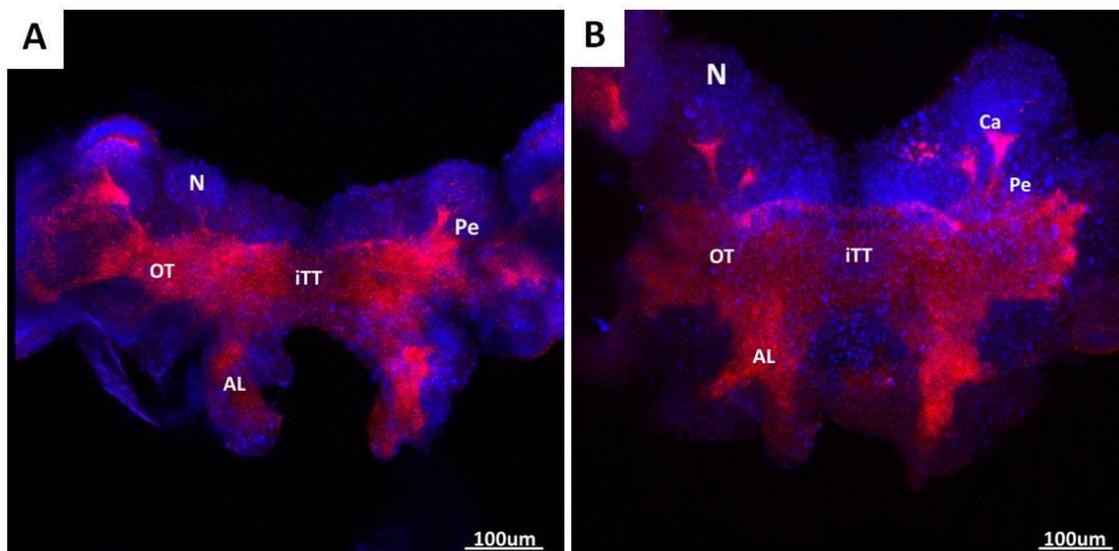


Figura 3 - Cérebro de operária (A) e rainha (B) *A. mellifera* durante o quinto estágio do desenvolvimento larval. Os cérebros foram corados com DAPI (núcleos, em azul) e faloidina (filamentos de actina-F, em vermelho). Notam-se claramente estruturas dos corpos cogumelares: cálices (Ca) e pedúnculos (Pe), e lobos antenais (AL) bem mais desenvolvidos em rainhas.

Fonte: MODA et al., em prep.

A proliferação neural nos corpos cogumelares inicia-se no primeiro estágio larval, pela divisão celular simétrica de neuroblastos (MALUN, 1998; FARRIS et al., 1999). Roat e Landim (2008) mostraram que o cérebro de rainhas apresenta uma área maior de neuroblastos em relação ao cérebro de operárias durante o último estágio larval e a primeira metade do desenvolvimento pupal. Este crescimento manifesta-se morfologicamente em cérebros diferencialmente desenvolvidos, sendo mais aparente entre o quarto e o quinto estágio larval (MODA et al. em prep.).

Embora algumas poucas células menores estejam associadas aos grupos de neuroblastos nos dois primeiros estágios, um grande número de células-mães ganglionares (GMCs) aparece inicialmente em L4. GMCs com fusos mitóticos aparecem primariamente nos limites exteriores de cada grupo de neuroblastos, aparentemente movendo-se para a superfície do grupo antes de se dividirem para produzir duas células Kenyon. Conforme a neurogênese procede, mais GMCs

migram para a superfície do grupo e dividem-se e as novas células Kenyon deslocam as células nascidas anteriormente para longe do centro. Células Kenyon movem-se, de maneira preferencial, dorsalmente e externamente, como uma consequência das diferentes posições dos grupamentos de neuroblastos relativas à neurópila dos corpos cogumelares. O resultado neste caso é um arranjo concêntrico de corpos de células Kenyon associado a cada cálice de corpos cogumelares adultos (FARRIS et al., 1999).

A neurópila de corpos cogumelares aumenta seu volume cerca de 30% nas três primeiras semanas de vida, evento que coincide com o início do forrageamento. Este processo de crescimento pode ser acelerado pelo início precoce deste tipo de comportamento (WITHERS et al., 1993, 1995; DURST et al., 1994), mas ocorre mesmo em abelhas criadas no isolamento social e no escuro (FAHRBACH et al., 1998). Como esperado, as operárias possuem corpos cogumelares proporcionalmente maiores e mais desenvolvidos do que as rainhas (MICHENER, 1974; MODA et al., em prep.). Notavelmente, apesar dos corpos cogumelares não apresentarem neurogênese adulta, eles permanecem muito plásticos durante a vida adulta, exibindo um volume dependente de experiências, devido a dendritos maiores e mais ramificados (WITHERS et al., 1993; FARRIS et al., 2001).

A neurogênese diferencial que favorece o desenvolvimento do cérebro das operárias deve, portanto, ocorrer durante a segunda metade do período pupal. Foi observado que o cérebro das rainhas é caracterizado por um número maior de eventos de morte celular durante o desenvolvimento pupal em relação ao das operárias (MALUN, 1998; GANESHINA et al., 2000; MALUN et al., 2003; Roat; Landim, 2008), o que ajuda a explicar as relações cérebro/corpo e tamanho dos corpos cogumelares/cérebro características de operárias adultas (MICHENER, 1974).

1.6 Quais são os genes que ligam alimentação ao desenvolvimento diferencial do cérebro de larvas em castas de *A. mellifera*?

As fêmeas de abelhas *A. mellifera* que recebem uma quantidade menor de alimento durante o período larval tornam-se operárias, casta cujo cérebro adulto é proporcionalmente mais desenvolvido em relação ao das rainhas. Durante a maior

parte do desenvolvimento pós-embriônico, entretanto, o cérebro das rainhas mostra uma área maior de neuroblastos em relação ao das operárias. Além disso, o desenvolvimento de estruturas cerebrais durante o período larval é bem mais rápido em rainhas (MODA et al., em prep.), o que reflete a importância de uma dieta mais rica como responsável por um maior desenvolvimento inicial do sistema nervoso. As rainhas em desenvolvimento, além de receberem mais alimento, possuem uma dieta mais homogênea do que as primeiras, devido à grande quantidade de proteínas específicas da geleia real (principalmente *major royal jelly proteins*; DRAPEAU et al., 2006).

Partindo-se do fato de que a alimentação diferencial oferecida às larvas *A. mellifera* conduz à formação de diferentes castas, as primeiras etapas da neurogênese de abelhas constituem um experimento natural e um bom modelo para a identificação de genes que ligam a nutrição diferencial ao desenvolvimento diferencial do sistema nervoso, particularmente do cérebro.

Em um trabalho preliminar, nosso grupo mostrou, mediante a identificação de perfis de expressão de genes individuais [por PCR quantitativa em tempo real (PCRq)], que o maior desenvolvimento do cérebro de rainhas durante o período larval está, em partes, associado à regulação positiva de *shot* (MODA et al., em prep.). Experimentos em escala genômica, como o presente estudo, fornecem uma visão ampla da influência nutricional sobre o desenvolvimento do sistema nervoso em animais, particularmente, sobre o cérebro de insetos. Dadas as similaridades existentes entre o sistema nervoso e a biologia dos precursores neurais de insetos e mamíferos, o conhecimento dos mecanismos de controle da plasticidade fenotípica nos primeiros poderá contribuir com o entendimento de como os fatores nutricionais regulam a programação fetal e algumas doenças em humanos.

2 OBJETIVOS

Os nossos objetivos subdividem-se em geral e específicos.

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral identificar mediadores moleculares da ação nutricional sobre o desenvolvimento do cérebro em larvas de castas de *A. mellifera*.

2.2 Objetivos específicos

Nossos objetivos específicos foram os seguintes:

- Identificar transcritos diferencialmente representados (TDRs) em cérebros de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval (L4) através de *microarrays* de oligonucleotídeos e caracterizá-los *in silico*;
- Determinar, pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (PCRq), perfis de transcrição de TDRs no cérebro de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, será apresentada a visão geral da metodologia utilizada em nosso estudo, sendo esta posteriormente relatada mais detalhadamente.

3.1 Visão geral

Para o *screening* inicial mediante abordagem genômica de hibridação de *microarrays* de DNA, rainhas e operárias *A. mellifera* do quarto estágio de desenvolvimento larval (L4) foram coletadas do Apiário Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo.

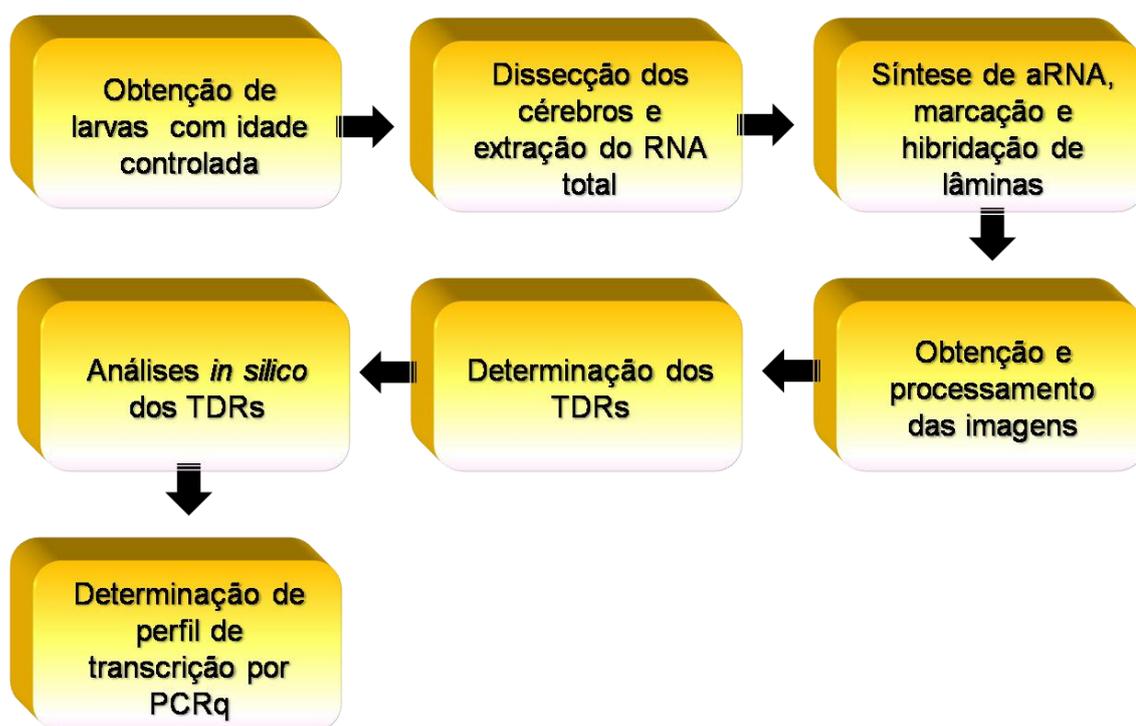


Figura 4 - Fluxo experimental. TDRs: Transcritos diferencialmente representados.
Fonte: Da autora.

As abelhas coletadas tiveram o cérebro dissecado, do qual foi extraído RNA total. O RNA total foi purificado e utilizado como molde para a síntese de cDNA, a partir do qual foi sintetizado aRNA marcado com fluoróforos

diferenciados. Este foi hibridado em lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos correspondentes a todos os genes conhecidos do genoma de *A. mellifera*. Após a obtenção e quantificação das imagens de hibridação, os TDRs foram selecionados através de normalização e análises estatísticas sendo, então, analisados *in silico*. Finalmente, usando PCR quantitativa em tempo real, foi determinado o perfil de transcrição do gene *GlcAT-P* (GB12529) para o terceiro (L3), quarto (L4) e quinto (L5F2, L5S1) estágios larvais.

3.2 Obtenção de abelhas e cérebros

Larvas de rainhas e operárias foram coletadas de amostras mantidas no Apiário Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Para o experimento de *microarray* de nucleotídeos, foram estudadas larvas no quarto estágio larval (L4). Este estágio foi escolhido por apresentar as maiores diferenças nos títulos de HJ entre rainhas e operárias, ambiente hormonal hipotetizado como um dos responsáveis pela expansão neural durante o desenvolvimento larval de *A. mellifera* (HARTFELDER; ENGELS, 1998; BARCHUK et al., 2007). Para a PCR quantitativa em tempo real, foram utilizadas larvas no terceiro (L3), quarto (L4) e quinto (L5F2, L5S1) estágios larvais.

Tanto para a obtenção de operárias quanto de rainhas, foi realizado um procedimento inicial, com a finalidade de controlar as idades larvais (BARCHUK et al., 2002). Para cada postura, uma rainha foi aprisionada por, aproximadamente, 6 horas, sob uma tela de exclusão (ou caixa Jenter, Figura 5), em uma região do favo com células de cria vazias, para que fosse realizada a postura de ovos fecundados. Parte das larvas eclodidas foi transferida para realeiras artificiais, contendo geleia real, e colocada de volta nas colônias, sendo que as larvas remanescentes foram naturalmente criadas como operárias. As larvas permaneceram nas colônias até o dia da coleta, sendo que as fases do desenvolvimento de operárias e rainhas foram identificadas, respectivamente, de acordo com Michelette e Soares (1993; Tab. 1) e Rembold et al. (1980; Tab. 2, para abelhas europeias).



Figura 5 – Aprisionamento de rainha para a obtenção de larvas com idade controlada. À esquerda, fumaça para facilitar a abertura da caixa. À direita, prendendo a rainha em caixa Jenter (para a postura de ovos). Fotos tomadas durante manipulação de quadros em experimentos pilotos realizados no Apiário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (Ifsuldeminas), Campus Muzambinho.

Fonte: Da autora.

A dissecação de cérebros foi realizada em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada e com o auxílio de lupa (16X). Cada amostra continha, aproximadamente, 15 cérebros, sendo que foram coletadas duas de cada casta, ambas em L4. Os cérebros foram armazenados em reagente TRIzol (Invitrogen) a -80°C até o momento da extração do RNA total. Esta etapa teve a colaboração da Técnica Marcela Bezerra Laure, do Laboratório de Biologia e Genética do Desenvolvimento de Abelhas do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP).

TABELA 1

Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. A duração dos estágios larvais no desenvolvimento pré-imaginal refere-se às horas após eclosão.

FASE	CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO (horas)
Ovo	Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)
L1	Peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após eclosão)
L2	Peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
L3	Peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
L4	Peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5F1	Peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
L5F2	Peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
L5F3	Peso – 0,11 a 0,16 g	105-115
L5S1	Célula operculada, larva com intestino cheio	115-130
L5S2	Célula operculada, larva com intestino semi cheio	130-145
L5S3	Célula operculada, larva com intestino vazio	145-160
PP1	Comprimento tibia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	160-180
PP2	Comprimento tibia-tarso = 2,0 a 2,6 mm	180-190
PP3	Comprimento tibia-tarso > 2,6 mm	190-230
Pw	Pupa de olho branco (<i>white</i>)	230-250
Pp	Pupa de olho rosa (<i>pink</i>)	250-265
Pdp	Pupa de olho rosa-escuro	265-305
Pb	Pupa de olho marrom (<i>brown</i>)	305-330
Pbl	Pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax	330-370
Pbm	Pupa de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária	370-390
Pbd	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	
RN	Operárias com até 24 horas de vida	

Fonte: MICHELETTE; SOARES, 1993. (Salientados, os estágios das abelhas utilizadas em nossos experimentos).

TABELA 2

Características utilizadas para classificar o desenvolvimento larval (L) e pupal (P) de rainhas de abelhas europeias, *Apis mellifera carnica*.

FASE	CARACTERIZAÇÃO	DURAÇÃO horas)
Ovo	Embriões de 0 a 72 horas	72 (antes da eclosão)
L1	Peso – 0,0001 a 0,0003 g	0-20 (após eclosão)
L2	Peso – 0,0003 a 0,001 g	20-35
L3	Peso – 0,0015 a 0,004 g	35-55
L4	Peso – 0,004 a 0,0248 g	55-80
L5F1	Peso – 0,029 a 0,06 g	80-95
L5F2	Peso – 0,06 a 0,11 g	95-105
L5F3	Peso – 0,11 a 0,16 g	105-115
L5S1	Célula operculada, larva com intestino cheio	115-130
L5S2	Célula operculada, larva com intestino semi cheio	130-145
L5S3	Célula operculada, larva com intestino vazio	145-160
PP1	Comprimento tíbia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	145-160
PP2	Comprimento tíbia-tarso = 2,0 a 2,6 mm	160-180
PP3	Comprimento tíbia-tarso > 2,6 mm	180-190
Pw	Pupa de olho branco (<i>white</i>)	190-230
Pp	Pupa de olho rosa (<i>pink</i>)	230-250
Pdp	Pupa de olho rosa-escuro	250-265
Pb	Pupa de olho marrom (<i>brown</i>)	265-305
Pbl	Pupa de olho marrom, com pigmentação leve no tórax	305-330
Pbm	Pupa de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária	330-370
Pbd	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390
RN	Operárias de até 24 horas de vida	

Fonte: REMBOLD et al., 1980. (Salientados, os estágios das abelhas utilizadas em nossos experimentos).

3.3 Obtenção de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol[®], de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen), e purificado utilizando-se o kit *RNA Cleanup (RNeasy Mini Kit, Qiagen)*. A quantificação do RNA total extraído foi realizada em *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies). A razão entre as leituras de 260 e 280 nm foi utilizada como um indicador da pureza do RNA, sendo que os valores obtidos estavam dentro do intervalo de 1.9 e 2.0, utilizado como o ideal. Considerou-se que uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA (SAMBROOK et al., 1989).

3.4 Hibridação das lâminas de *microarray*

O fluxo deste procedimento consistiu em 4 etapas: (1) síntese de cDNA, (2) síntese de aRNA e marcação com fluoróforos; (3) hibridação de lâminas de *microarray*; (4) lavagem e escaneamento das lâminas (BARCHUK et al., 2007; BOMTORIN et al., 2009; SOARES et al., 2009).

As lâminas de *microarray* (BeeOligo 121106; Functional genomics, University of Illinois (http://www.biotech.uiuc.edu/centers/Keck/Functional_genomics/Honey%20Bee%20Oligo.htm)) foram adquiridas através do Dr. G. E. Robinson (Illinois University, Urbana, USA). Estas apresentam 28.800 sequências, dispostas em 48 quadrantes, contendo 14.400 *spots* em réplicas duplas, que correspondem a, aproximadamente, todo o genoma de *A. mellifera*, sendo que cada um dos oligos é composto por 36 nucleotídeos e foram sintetizados pela Invitrogen.

A síntese de cDNA foi feita a partir de, aproximadamente, 1 µg de RNA total para todas as amostras. A síntese das sondas fluorescentes para a hibridação das amostras utilizou o kit *Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification*, de acordo com o protocolo do fabricante (Ambion). Para cada lâmina foram produzidas duas sondas, uma com o fluoróforo Cy3 e outra com o Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, GE).

Para a fixação dos oligonucleotídeos, as lâminas foram, inicialmente, umedecidas em vapor de água milliQ, secas em bloco térmico por cerca de 5 segundos e expostas a luz ultravioleta (6000 x 100 µJ/cm²). Após esta etapa,

foram lavadas para a remoção do excesso de oligonucleotídeos que não foram fixados. A primeira lavagem foi feita agitando as lâminas por 2 min em solução de SDS 0,2 %. Então, seguiram-se duas lavagens em água com alto grau de pureza e, por último, em isopropanol. Logo, as lâminas foram centrifugadas por 3 min a 2000 rpm.

Após esta etapa, as lâminas foram incubadas em solução de pré-hibridação (10 mL de formamida, 2.5 mL de solução de Denhardt 100x, 16.6 mL de SSC 20 x, 0.5 mL de SDS 10% e 0.25 mL de tRNA 10 mg/mL, completando com água com alto grau de pureza para o volume final de 50 ml) a 42°C por, no mínimo 60 min. Depois de retiradas da solução de pré-hibridação, as lâminas foram lavadas por mais duas vezes em água, uma vez em isopropanol, e centrifugadas por 3 min a 2000 rpm. As lâminas foram então mantidas a 55°C até o momento da hibridação, que foi realizada a 42°C por, aproximadamente, 22 horas. Para retirar o excesso de solução de hibridação e reduzir o *background*, as lâminas foram lavadas 2 vezes por 2 min com cada uma das soluções SSC 2X, SDS 0.1%; SSC 0.5X, SDS 0.01%; SSC 2X; SSC 0.1X e, após, foram realizadas mais duas lavagens em água, para posterior centrifugação por 2 min a 2000 rpm.

Para reduzir as diferenças entre cada tipo de fluoróforo, as amostras foram hibridizadas às lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos em *dye-swap*. Neste tipo de desenho experimental, dois tipos de amostras marcadas com diferentes fluoróforos são hibridados na mesma lâmina. Em uma segunda lâmina, ambas as amostras são hibridizadas, entretanto, com a inversão do tipo de fluoróforo utilizado na marcação de cada uma delas. Sendo assim, na primeira lâmina foi hibridado o RNA extraído do cérebro de operárias marcado com Cy3 e o extraído do cérebro de rainhas marcado com Cy5 e, na segunda lâmina, foi feito o inverso.

As lâminas hibridizadas foram escaneadas no *Scanner Axon GenePix 4000B*, com 5 µm de resolução, utilizando filtros para Cy3 com *laser* de 532 nm de comprimento de onda (verde) e, para Cy5, de 635nm (vermelho). Na quantificação das imagens de hibridação foi utilizado o *GenePix Pro Software*. Esta etapa foi realizada no Laboratório do Departamento Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP (*campus* Jaboticabal), liderado pela Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos.

3.5 Bioinformática

Os TDRs entre os cérebros de operárias e rainhas em L4 foram obtidos após normalização e análises estatísticas dos dados gerados pelo *GenePix Pro Software* utilizando o Pacote Limma no Programa R (R Development Core Team, 2010). Limma é um pacote do R que analisa dados de experimentos sobre expressão gênica diferencial com *microarrays* através de modelos lineares empregando Estatística Bayesiana Empírica para fornecer resultados estáveis, mesmo quando o número de matrizes é pequeno (SMYTH et al., 2003). O *script* utilizado em nossas análises (ANEXO) foi baseado naquele utilizado por Barchuk e colaboradores (2007).

A normalização de dados de hibridações de *microarrays* visa ajustá-los para eliminar alterações decorrentes de variações da técnica durante sua realização. Os dados foram pré-processados para a correção do *background* para evitar valores negativos ou intensidades iguais a zero, utilizando o método “*normexp*”, adicionando aos valores de *background* corrigidos uma intensidade *offset* de 50. Este método ajusta o *foreground* de acordo com as intensidades de *background* e resulta em intensidades ajustadas positivamente. O uso de um *offset* de 50 reduz a variação dos *log-ratios* de *spots* com intensidades muito baixas em direção a zero. As normalizações das próprias lâminas, assim como entre elas, foram executadas utilizando “*print tip loess*” para corrigir os efeitos de localização e dos corantes. Cada M-valor é normalizado pela subtração do valor correspondente ao grupo da extremidade da curva de Loess (SMYTH; SPEED, 2003).

Para a construção das matrizes de análise, quando foram feitas as comparações entre amostras de rainhas e operárias, foram utilizados os valores de operárias como referência. Então, as duplicatas foram corrigidas, perfazendo assim um total de 14.400 *spots* a serem analisados em cada lâmina. Após as normalizações, o valor de *fold-change* (\log_2) e seu erro padrão para cada gene foram calculados utilizando uma regressão linear para a normalização dos dados de expressão, através de Estatística Bayesiana Empírica. Ao final, foi plotado um gráfico *Volcano* com TDRs entre as amostras.

Os TDRs entre o cérebro de rainhas e operárias durante L4 foram, então, analisados *in silico*. A sequência nucleotídica de cada TDR, impressa nas lâminas de *microarrays*, foi recuperada a partir de um arquivo fornecido pelo fabricante do *chip*. Por meio da ferramenta NCBI BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997), cada sequência foi localizada no genoma de *A. mellifera*, versão 4.0, e as respectivas sequências preditas das regiões codificadoras (CDS) foram recuperadas com o uso da ferramenta ExtraSeq (ZULU, 2011).

As anotações foram realizadas usando a sequência completa predita do RNAm disponível no GenBank (2011), com entrada para anotação manual na plataforma Artemis 7.0 (RUTHERFORD et al., 2000), e utilizando-se a versão 4.0 do genoma de *A. mellifera* (WEINSTOCK, 2006) e o algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Adicionalmente, a busca por domínios conservados foi realizada por meio da ferramenta NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011). A tradução conceitual para aminoácidos foi submetida à análise de outras características bioquímicas através de ferramentas disponíveis em http://expasy.org/tools/pi_tool.html.

Para auxiliar a elaboração dos esquemas da organização dos genes, foi criada uma macro na linguagem de programação *Visual Basic for Applications* no Microsoft Excel (2010), no qual o número de bases dos éxons e dos íntrons é digitado em diferentes campos. Ao clicar em um botão, o código é executado e uma imagem é gerada, de acordo com as proporções de éxons e íntrons. Os primeiros são representados em caixas e, os segundos, em linhas.

3.6 Determinação dos perfis de transcrição de *GlcAT-P* mediante PCR quantitativa em tempo real

A análise do perfil de transcrição de TDRs selecionados a partir das hibridações de *microarrays* foi realizada através de RT-PCR em Tempo Real utilizando-se SYBR[®] Green e *primers* específicos no sistema *7500 Real Time PCR (Applied Biosystems)* do Laboratório de Biologia Animal Integrativa do Departamento de Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da Unifal-MG [MCT/FINEP/CT-INFRA - PROINFRA - 01/2008 LABSBIOEX (0336/09)]. Para cada estágio estudado (L3, L4, L5F2 e

L5S1), foram analisadas, em triplicata, três amostras de cDNA, provenientes de RNAs obtidos a partir de cérebros de operárias e rainhas (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas). O gene codificador da proteína ribossomal-49 (*ribosomal protein 49, rp49*), constituinte estrutural dos ribossomos, foi utilizado como controle endógeno (referência) nas reações de PCRq (LOURENÇO et al., 2008; Tab. 3).

No desenho dos *primers* foram utilizados os *softwares* *Primer Express for Real Time PCR* (versão 3.0; *Applied Biosystems*) e *Primer 3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000). A plataforma Artemis foi utilizada para verificar se os pares de *primers* encontram-se em éxons diferentes, para que amplifiquem um fragmento de tamanho maior do que o esperado, caso haja contaminação das amostras por DNA genômico. A ferramenta BLAST foi empregada na análise do nível de especificidade de cada um deles. Como os *primers* foram utilizados para PCR em Tempo Real, os fragmentos amplificados deveriam ter de 100-120 pb e uma temperatura de anelamento entre 57 e 62°C. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tab. 3.

TABELA 3
Primers desenhados para a amplificação dos TDRs de interesse.

Gene	Foward Primer	Reverse Primer
GB12549 (<i>GlcAT-P</i>)	GGATTGAAGTTCGAGCATCTG	CTCTGATCCATTGTAAGCCAC
AF441189 (<i>rp49</i>)	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	TTGAGCACGTTCAACAATGG

Fonte: Da autora.

Antes da validação dos perfis de transcrição dos TDRs por PCR quantitativa em tempo real, os *primers* foram testados para garantir que se ligassem apenas à região de interesse no genoma de *A. mellifera*. Isto foi realizado através de PCR convencional, utilizando a seguinte programação: 1 ciclo de 2 min a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s na T_m (*Temperature melting*) de cada *primer* e 30 s a 72°C; 1 ciclo de 7 min a 72 °C. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão BS e corados

com *SYBR Green*. As bandas foram visualizadas através de um transiluminador UV.

A seguir, foram determinadas as condições nas quais os *primers* teriam alta e igual eficiência, de tal forma que suas amplificações pudessem ser comparadas nos experimentos definitivos. Para tanto, realizamos reações em diferentes concentrações dos *primers* (1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) e do *pool* de amostras de cDNA de larvas de rainhas e operárias (1:5, 1:50, 1:500 e 1:5.000) no sistema *7500 Real Time PCR*. Desta forma, verificamos que a concentração ideal destes *primers* é 10 μ M e que as eficiências estavam próximas de 99%, nas seguintes condições de PCR: 1 ciclo de 2 min a 50 °C, 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min na T_m (58° C para *rp49* e 60 °C para *GlcAT-P*) e um ciclo final de 95 °C por 15s.

A partir da amplificação destes produtos, os valores de *Slope*, fornecidos após a construção de uma curva de regressão linear (valores da curva padrão), foram utilizados para a verificação da eficiência da reação (E) mediante a fórmula (User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System): $E=10^{(-1/Slope)}-1$.

A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada mediante análise da curva de dissociação para cada amostra. R^2 é o fator de correlação linear entre as concentrações do produto amplificado e os valores de seus ciclos limítrofes (*threshold cycle*, *Ct*). Quanto mais R^2 está próximo do valor 1, mais adequado. Os valores de quantificação relativa foram calculados utilizando-se o Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo que o menor valor de dCt tomado como referência unitária foi L4 de rainhas. Os resultados das amostras de rainhas e operárias foram considerados diferentes quando $p<0,05$ (*Mann-Whitney*; Statistica v8.0).

4 RESULTADOS

4.1 Transcritos diferencialmente representados entre o cérebro de rainhas e operárias durante L4

Moda et al. (em prep.) mostraram que estruturas fundamentais do cérebro de rainhas *A. mellifera* são maiores e desenvolvem-se mais rapidamente em relação às de operárias durante o período larval. Isto ocorre, possivelmente, pela ativação de diferentes redes gênicas entre as castas, sendo estas influenciadas pela alimentação diferencial a partir de L3.

Visando encontrar mediadores moleculares que respondem ao diferencial alimentar em castas *A. mellifera*, conduzindo ao maior desenvolvimento do cérebro de rainhas, identificamos transcritos diferencialmente representados (TDRs) entre o cérebro de rainhas e operárias em L4 através da hibridação de lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos com amostras de RNA.

A análise dos nossos resultados mostra que a normalização eliminou as discrepâncias de *foreground* e *background* (Figura 6 – A e B), produzindo dados confiáveis. A Figura 6 - C apresenta um gráfico do tipo M-A, ou seja, M-valores (contrastes de expressão) *versus* A-valores (níveis de expressão) das sequências analisadas e de controles internos. Os valores positivos referem-se às sequências de operárias, utilizadas como controles, e os negativos, às de rainhas. Como esperado para um gene estrutural, nota-se que *actina* foi transcrito nas duas castas em níveis semelhantes, uma vez que seus marcadores estão próximos de zero, o que indica que o experimento de hibridação permite a determinação de genes diferencialmente transcritos entre as amostras. Outra observação importante é a fluorescência máxima dos *spots* vazios, ou seja, 11. Sendo assim, não foram considerados aqueles TDRs com níveis de transcrição inferiores a este valor.

A Figura 6 - D representa um Gráfico Volcano contendo todas as sequências diferencialmente transcritas entre o cérebro de rainhas e operárias em L4, sendo que os pontos acima da linha vermelha representam os genes com *p*-valor menor que 0.05. Em relação a estes genes, os pontos à esquerda da linha azul correspondem à $\log_2(\textit{fold-change}) = -1$ e aqueles à direita desta linha correspondentes à $\log_2(\textit{fold-change}) = 1$, somando 16 TDRs, os quais foram

selecionados para nossas análises. Sendo assim, na Figura 6, dos 350 TDRs (resultantes da análise inicial, ver *Script* em Anexo I) estão representados apenas os TDRs com altos valores de diferença de expressão entre cérebros de rainhas e operárias (*Top 16*, transcritos mais abundantes, representados pelo menos duas vezes no cérebro de uma casta em relação à outra).

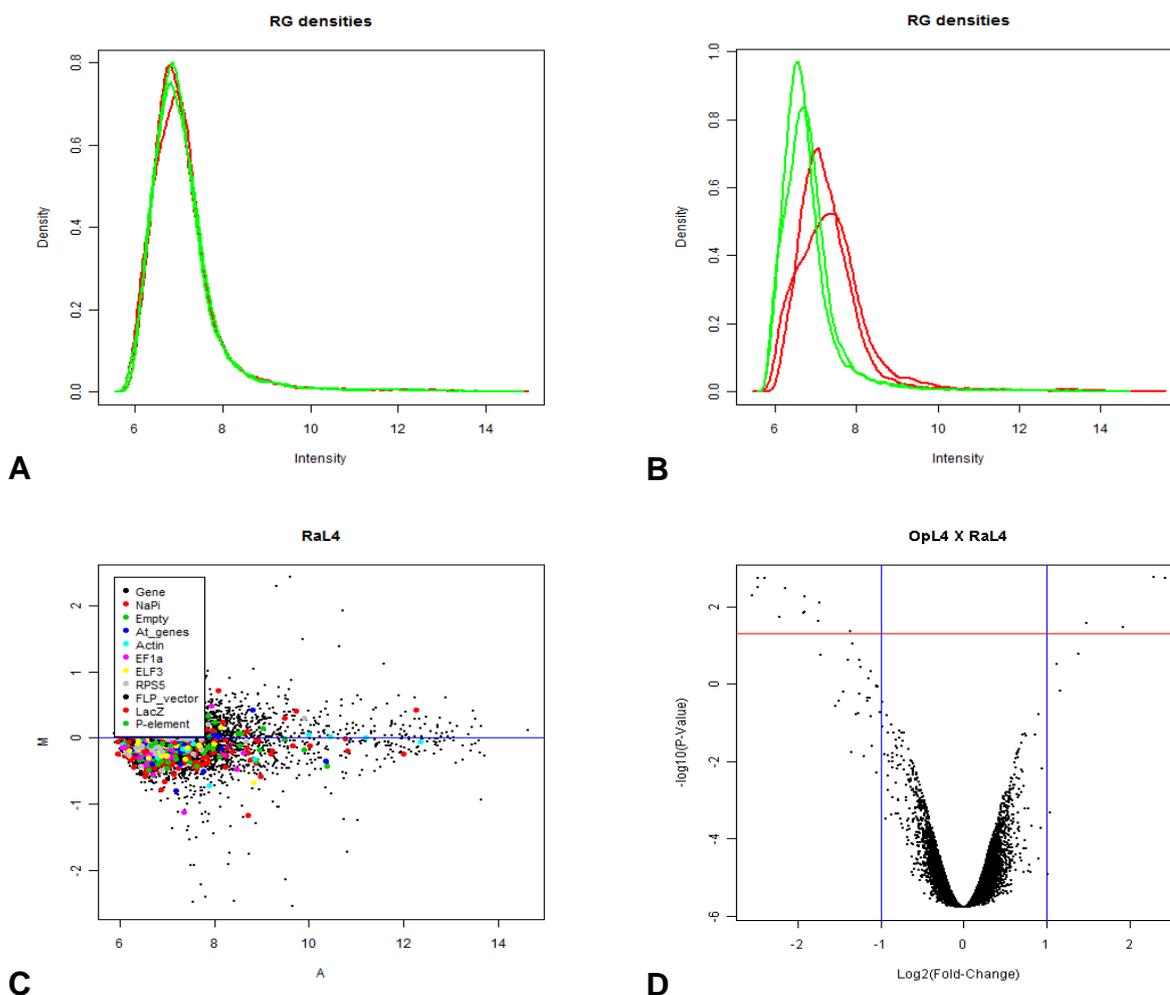


Figura 6 - Gráficos plotados a partir da análise das hibridações lâminas de *microarrays* contendo sequências representativas de todo o genoma de *A. mellifera* com amostras do cérebro de rainhas e operárias em L4. **A**: Normalizações de Cy3 e Cy5 em cada lâmina; **B**: Normalizações de Cy3 e Cy5 entre as lâminas de cada análise; **C**: Gráfico de dispersão de M-valores *versus* A-valores das hibridações. Controles internos: **D**: Gráfico Volcano representando as sequências diferencialmente transcritas.

Fonte: Da autora.

4.1.1. Transcritos super-representados em cérebro de rainhas

Dentre os 16 TDRs, 12 são mais representados no cérebro de rainhas e quatro, em operárias. Os produtos dos transcritos mais representados nas primeiras estão relacionados à proliferação, fasciculação e conexão neural (Tab. 4).

TABELA 4

Características de genes mais transcritos no cérebro de rainhas em relação ao de operárias *A. mellifera* no quarto estágio larval. ORF: *Open Reading Frame*. Pfam: domínio conservado.

Official_set_ID	ORF (pb)	Product (aa)	Scaffold_ID (Group)	Acess Number (XP_)	Pfam	Fold-change
GB11706	9510	3170	6.26	623961.2	Superfamília PWWP	3,79
GB12021	2835	945	4.27	396029.4	Superfamília SET	4,64
GB12545	2730	909	15.29	625229.1	Família Vinculina	5,28
GB12549	1119	373	11.34	394932.3	Superfamília Glicosiltransferase A	5,55
GB15759	1785	595	1.64	394160.2	Superfamília Simportador Sódio:Soluto	5,57
GB18914	675	225	9.21	1121927.2	Família <i>zinc ribbon</i>	5,85
GB18982	2172	724	Un.537	393301.3	Superfamília Apc4	3,36
GB19686	1068	356	7.26	395164.3	Família epimerase/desidratase dependente NAD	3,34
GB19966	1491	496	15.21	395239.4	Aminoácido permeasse	3,75

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB11706, super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 3,79), apresenta identidade com a proteína hipotética LOC551566 de *A. mellifera*. O GB11706 está organizado em 5 éxons e 4 íntrons, pertencendo ao grupo de ligação 6.26 (Figura 7). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico de genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH;

CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Esta sequência apresenta o domínio conservado Superfamília PWWP (Figura 8).

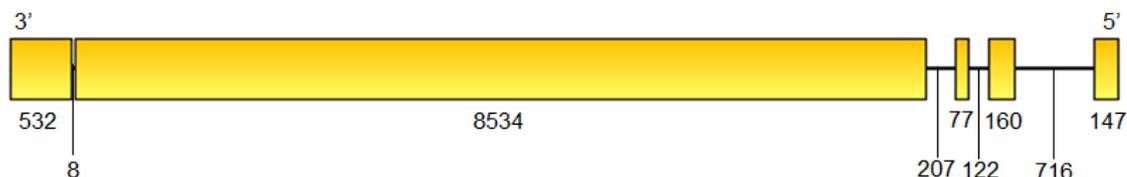


Figura 7 - Organização do gene GB11706 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

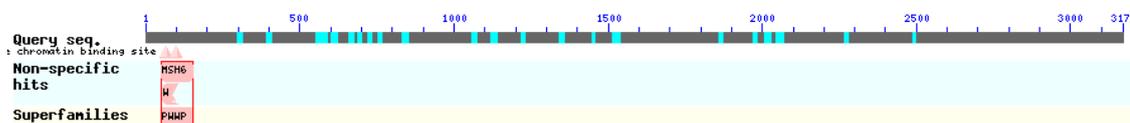


Figura 8 - Organização da proteína correspondente ao GB11706 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília PWWP.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB12021 (LOC412574) corresponde à proteína com dedos de zinco 10 com domínio PR (*PR domain zinc finger protein 10-like*). Tal sequência foi encontrada como diferencialmente transcrita no cérebro de rainhas e operárias em L4, sendo mais representada em rainhas (*Fold-change*: 4,64).

O gene GB12021 está organizado em 12 éxons e 11 íntrons e pertence ao grupo de ligação 4.27 (Figura 9). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico de genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981) foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. A família de proteínas de domínio PR apresenta similaridade ao domínio SET (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*; FIGURA 10).

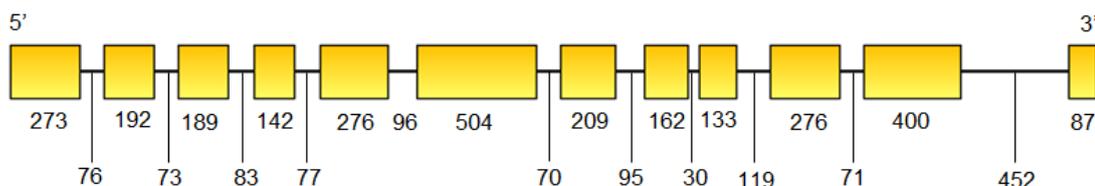


Figura 9 - Organização do gene GB12021 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

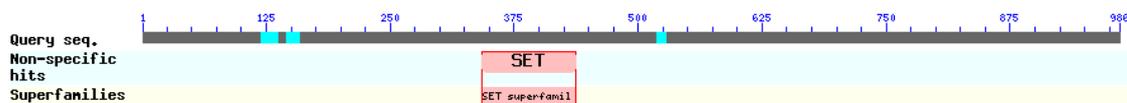


FIGURA 10 - Organização da proteína correspondente ao GB12021 mostrando o domínio conservado que caracteriza a superfamília SET.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência de aminoácidos referente ao GB12545 corresponde à proteína predita α -catenina de *A. mellifera*. Tal sequência foi encontrada como diferencialmente transcrita no cérebro de rainhas e operárias em L4, sendo mais representadas nas primeiras (*Fold-change*: 5,274). O GB12545 também apresenta similaridade de 85% em relação ao CG17947, sequência codificadora da α -catenina em *D. melanogaster*.

O gene da α -catenina está organizado em 6 éxons e 5 íntrons, pertencendo ao grupo de ligação Un.696 (Figura 11). O sítio canônico de processamento 5'-GT-AG-3', característico de genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981) foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Esta sequência apresenta um domínio conservado conhecido como Família Vinculina (Figura 12).

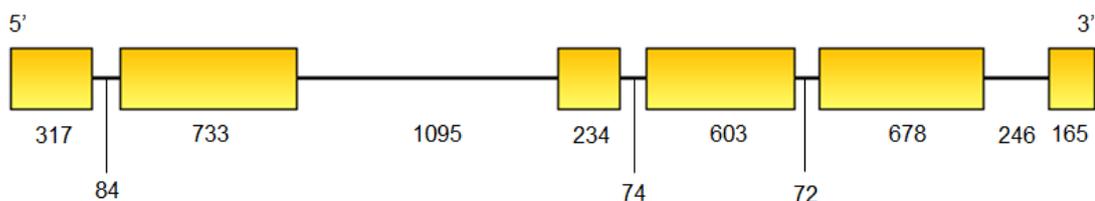


Figura 11 - Organização do gene GB12545 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.



Figura 12 - Organização da proteína correspondente ao GB12545 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Família Vinculina.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

O transcrito correspondente ao GB12549 encontra-se mais representado no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 5,551) e sua sequência de aminoácidos predita corresponde à da enzima GlcAT-P (*galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase P*). O GB12549 também apresenta similaridade de 63% em relação ao CG6207, sequência codificadora da mesma proteína em *D. melanogaster*.

O gene *GlcAT-P* está organizado em 4 éxons e 3 íntrons e pertence ao grupo de ligação 11.34 (Figura 13). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Esta sequência apresenta o domínio conservado conhecido como Superfamília de Glicosiltransferases A (cl11394; Figura 14).



Figura 13 - Organização do gene GB12549 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

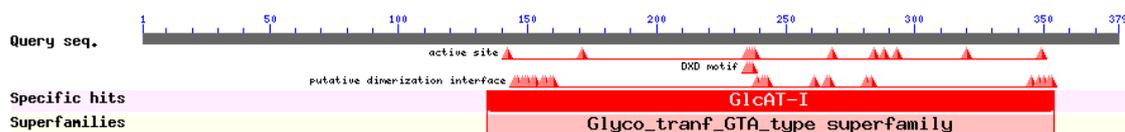


Figura 14 - Organização da proteína correspondente ao GB12549 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília de Glicosiltransferases A.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB15759, super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 5,57), apresenta identidade com o produto hipotético *sodium-coupled monocarboxylate transporter 2-like* de *A. mellifera*.

O GB15759 está organizado em 8 éxons e 7 íntrons e pertence ao grupo de ligação 1.64 (Figura 15). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. O transcrito referente ao GB15759 contém o domínio conservado da Superfamília Simportadores de Sódio (cl00456, Figura 16).

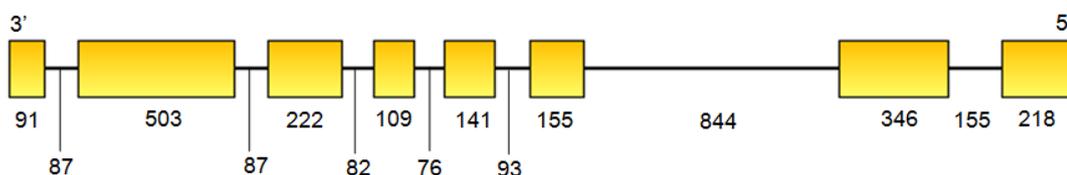


Figura 15 - Organização do gene GB15759 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.



Figura 16 - Organização da proteína correspondente ao GB15759 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília Simportadores de Sódio.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB18982 (LOC409810) é diferencialmente transcrita no cérebro de rainhas e operárias no em L4, sendo mais representada nas primeiras (*Fold-change*: 3,37). Este transcrito corresponde à quarta subunidade do complexo promotor da anáfase (*APC: anaphase promoting complex*). O GB18982 também apresenta similaridade de 28% em relação ao CG32707, sequência codificadora da mesma proteína em *D. melanogaster*.

O GB18982 está organizado em 7 éxons e 6 íntrons e pertence ao grupo de ligação Un.537 (Figura 17). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. A

sequência aminoacídica apresenta o domínio conservado da Superfamília Apc4, cujos membros possuem um longo domínio de repetições WD40 (Figura 18).

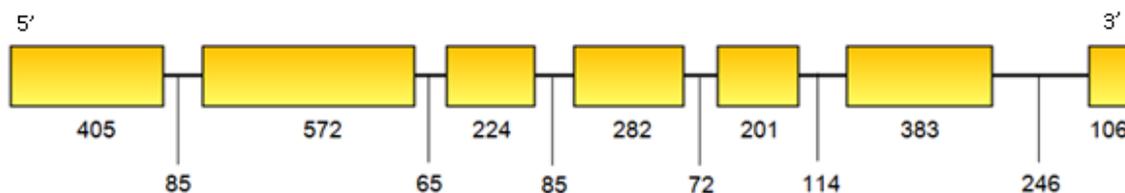


Figura 17 - Organização do gene GB18982 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

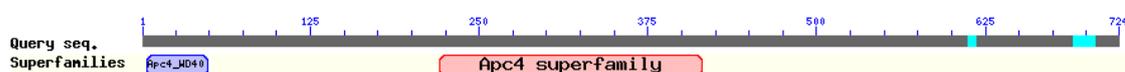


Figura 18 - Organização da proteína correspondente ao GB18982 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília Apc4.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência referente ao GB18914 corresponde à proteína hipotética de *A. mellifera* localizada no LOC726167. O gene está organizado em 3 éxons e 2 íntrons e pertence ao grupo de ligação 9.21 (Figura 19). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. A sequência protéica correspondente contém o domínio conservado Superfamília *zf-LITAF-like* (cl02754; Figura 20).

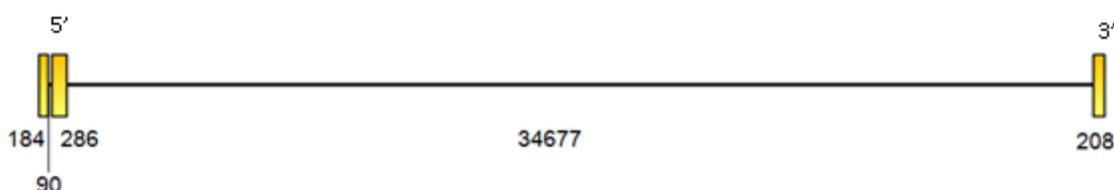


Figura 19 - Organização do gene GB18914 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

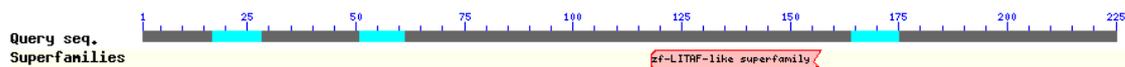


Figura 20 - Organização da proteína correspondente ao GB18914 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília zf-LITAF-like.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB19686 (LOC411696) corresponde à enzima GDP-D-manose 4,6-desidratase (GMDS). Tal sequência foi encontrada como super-representada no cérebro de rainhas em L4 (*Fold-change*: 3,343), tendo operárias na mesma fase como controles. O GB19686 apresenta similaridade de 75% em relação ao CG17947, sequência codificadora da mesma enzima em *D. melanogaster*.

O gene *GMD* encontra-se organizado em 7 éxons e 6 íntrons e pertence ao grupo de ligação 7.46 (Figura 21). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Contém região codificadora do domínio conservado Superfamília NABD_Rossmann (Figura 22).



Figura 21 - Organização do gene GB19686 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

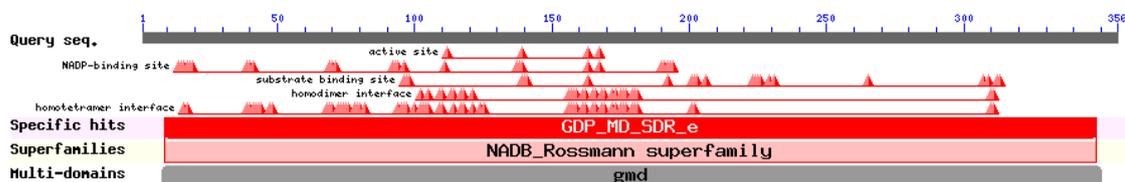


Figura 22 - Organização da proteína correspondente ao GB19686 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília NABD_Rossmann.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência correspondente ao GB19966, super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 3,75), apresenta identidade com a proteína predita *Y+L amino acid transporter 2-like* de *A. mellifera* e o CG1697, de *D. melanogaster*. O GB19966 está organizado em 10 éxons e 9 íntrons e pertence ao grupo de ligação 15.21 (Figura 23). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Esta sequência apresenta uma região codificadora do domínio conservado Aminoácido Permease (pfam00324, Figura 24).

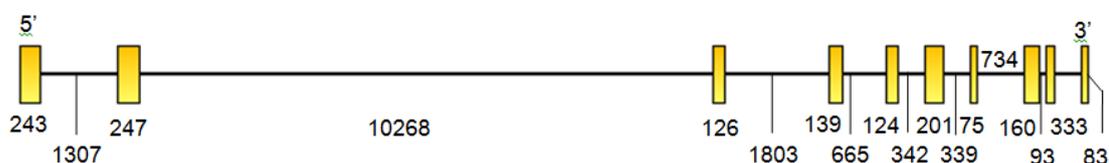


Figura 23 - Organização do gene GB19966 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.



Figura 24 - Organização da proteína correspondente ao GB19966 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Família Aminoácido Permease.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

4.1.2. Transcritos super-representados em cérebro de operárias

Dentre os 16 TDRs, quatro foram encontrados mais expressos em operárias. Seus produtos atuam, principalmente, no desenvolvimento de células dos olhos e de neurônios GABAérgicos (Tab. 5).

TABELA 5

Características de genes mais transcritos no cérebro de operárias em relação ao de rainhas *A. mellifera* no quarto estágio larval. ORF: *Open Reading Frame*. Pfam: domínio conservado. FC: *Fold-change*.

Official_set_ID	ORF (pb)	Product (aa)	Scaffold_ID (Grupo)	Access Number (XP_)	Pfam	FC
GB10931	948	316	Un.537	623418.2	PP2C	3,80
GB11875	555	185	Un.696	321929.1	-	4,90
GB16661	753	250	14.23	1121339.1	Superf. de Homeodomínios	5,39

A sequência predita de aminoácidos referente ao GB10931 (LOC551020) tem correspondência àquela da proteína fosfatase 2C (PP2C). Tal sequência foi encontrada como diferencialmente transcrita no cérebro de rainhas e operárias em L4, sendo mais representada no cérebro de operárias (*Fold-change*: 3,80). O GB10931 apresenta 64% de similaridade em relação ao CG17746, sequência codificadora da mesma proteína em *D. melanogaster*.

O GB10931 está organizado em quatro éxons e três íntrons e pertence ao grupo de ligação Un.537 (Figura 25). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Esta sequência contém a região codificadora do domínio conservado Superfamília PP2C (pfam00481; ver Figura 26).

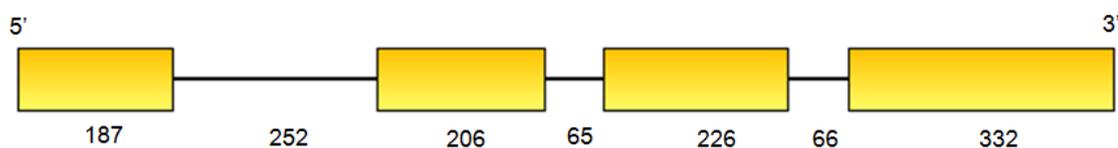


Figura 25 - Organização do gene GB10931 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

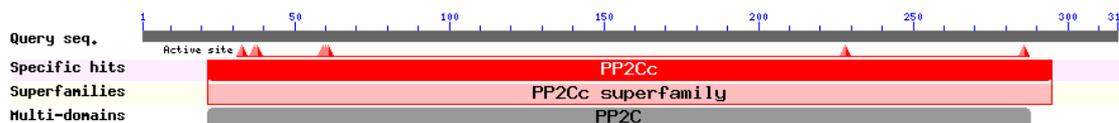


Figura 26 - Organização da proteína correspondente ao GB10931 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília PP2C.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

A sequência referente ao GB11875 não apresenta similaridade a nenhuma correspondente a uma proteína conhecida ou hipotética de *A. mellifera*, ou de outro organismo próximo. Entretanto, apresenta similaridade de 45% com a proteína hipotética Phum_PHUM085030 de *Pediculus humanus corporis*. Este gene está organizado em três éxons e dois íntrons e pertence ao grupo de ligação Un.696 (**Figura 27**). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-íntron-éxon. Não foi encontrado nenhum domínio conservado nesta sequência.



Figura 27 - Organização do gene GB11875 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB16661 (LOC725502) apresenta identidade à proteína *homeobox* similar a *aristalless (al)*. Tal sequência foi encontrada como diferencialmente representada no cérebro de rainhas e operárias em L4, sendo mais transcrita em operárias (*Fold-change*: 5,387). O GB16661 apresenta similaridade de 86% ao CG3935, codificador da mesma proteína em *D. melanogaster*, e 87% em relação ao CG2819 (*Pvull-Pstl homology 13, Pph13*).

O GB16661 está organizado em três éxons e dois íntrons e pertence ao grupo de ligação 14.23 (Figura 28). O sítio canônico de processamento, 5'-GT-AG-3', característico dos genes transcritos pela RNA Polimerase II (BRETHNACH; CHAMBON, 1981), foi encontrado em todas as junções éxon-

íntron-éxon. *A1* contém uma região codificadora do domínio conservado Superfamília de Homeodomínios (cl00084; Figura 29).

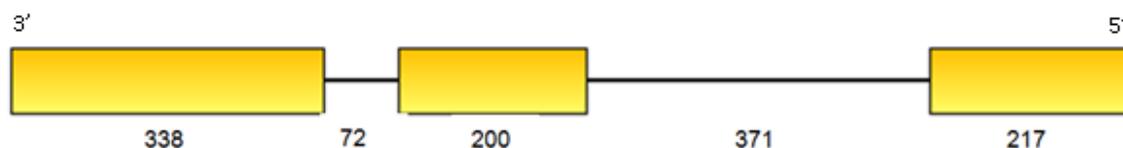


Figura 28 - Organização do gene GB16661 de *A. mellifera*. Os valores representam o tamanho de cada região em pares de bases. Éxons em caixas e íntrons em linhas.

Fonte: Da autora.

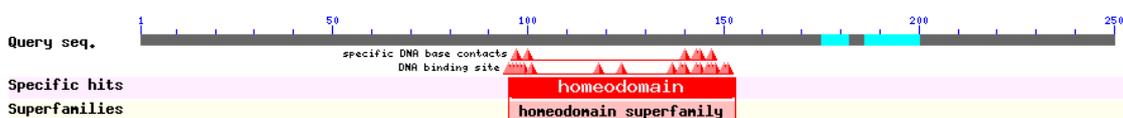


Figura 29 - Organização da proteína correspondente ao GB16661 mostrando o domínio conservado que caracteriza a Superfamília de Homeodomínios.

Fonte: NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011).

4.1.3 Transcritos diferencialmente representados sem número de acesso em bases de dados

Quatro dos 16 TDR, dois em operárias e dois em rainhas, não possuem associação a nenhum número de acesso no Official Gene Set (GB). Estes são designados por BB160007B10F02.5, BB170027A10E09.5, BB170032B20H12.5 e DB746346. A anotação destas sequências através da ferramenta Artemis mostrou que estão localizadas nas proximidades de ORFs (*Open Reading Frames*).

4.2 Perfil de transcrição de *GlcAT-P* em cérebro de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval

Aqui, apresentamos o perfil de transcrição no cérebro de rainhas e operárias em desenvolvimento larval (L3, L4, L5F2 e L5S1) de um dos genes encontrados como diferencialmente transcritos, o gene *GlcAT-P*. Os *primers* para este gene mostraram eficiência apropriada ($Slope = -2,146239$; $R^2 = 0,999294$), o

que permite a realização de estimativas de níveis de transcrição mediante a comparação de valores de $\Delta\Delta cT$.

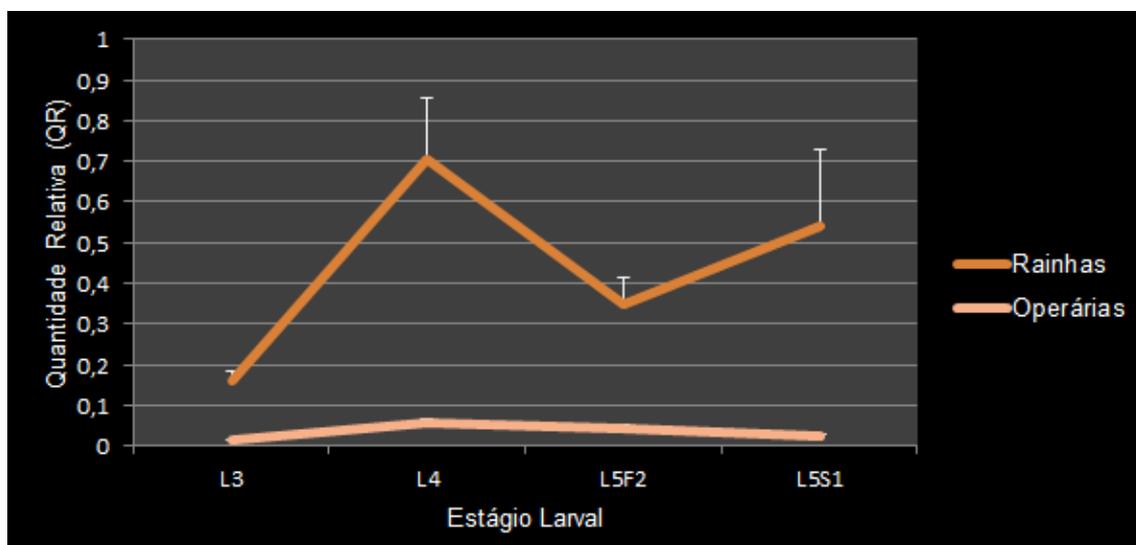


Figura 30 – Gráfico representando os valores obtidos por PCRq em Tempo Real. Eixo x: estágios do desenvolvimento larval (nomes por extenso, nas Tabelas 1 e 2). Eixo y: quantidades relativas [médias e erros de $2^{(-\Delta\Delta cT)}$]. Diferença estatística para todos os estágios (*Mann-Whitney* $p < 0,05$).

Conforme mostrado na **Figura 30**, os níveis de transcrição do gene *GlcAT-P* estimados por PCRq são maiores em cérebro de rainhas durante todo o período de desenvolvimento larval estudado (*Mann-Whitney* $p < 0,05$), sendo o nível em L4, por exemplo, 12 vezes maior do que em operárias. Em rainhas, ocorrem picos de transcrição em L4 e L5S1. Já em operárias, a transcrição do gene parece ser basal, apesar de mostrar valores maiores em L4.

5 DISCUSSÃO

A seguir, discutimos aspectos da biologia dos genes associados aos transcritos mais representados no cérebro de rainhas (item 5.1) e de operárias (item 5.2) em L4, bem como de seus produtos hipotéticos.

5.1 Sobre os transcritos mais representados no cérebro de rainhas em L4

De acordo com as análises *in silico*, nove dos 12 transcritos mais representados no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 apresentam número de acesso no Official Gene Set (GB). A sequência de aminoácidos predita referente ao GB11706, super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 3,79), apresenta identidade com a proteína hipotética LOC551566 de *A. mellifera*. A proteína correspondente ao GB11706 possui o domínio conservado Superfamília PWWP.

PWWP é um pequeno domínio formado por 100-150 aminoácidos, apresentando o motivo conservado Pro-Trp-Trp-Pro. Este domínio é geralmente encontrado em proteínas envolvidas na diferenciação, no crescimento e na divisão celular. A maioria das proteínas com domínio PWWP parece ser nuclear, frequentemente ligante de DNA, atuando como fatores de transcrição que regulam uma variedade de processos do desenvolvimento [NCBI *Conserved Domain* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

Como anteriormente mencionado, o GB11706 é mais transcrito no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4. Dada a presença do domínio PWWP nesta sequência, seu produto poderia atuar no cérebro de *A. mellifera* em processos tais como diferenciação, crescimento e divisão celular, favorecendo, principalmente, a neurogênese de rainhas, uma vez que é mais transcrito nesta casta durante L4.

A sequência de aminoácidos referente ao GB12021, a qual possui identidade com o domínio PR, é super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 4,67). A família de proteínas de domínio PR apresenta similaridade ao domínio SET [NCBI *Conserved Domain*

Search (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

A metilação de lisinas em histonas é reconhecida como uma importante forma de regulação gênica por fatores epigenéticos. A família de proteínas de domínio PR foi inicialmente estudada como candidata a uma nova classe de metiltransferases de lisinas em histonas por apresentar similaridade ao domínio SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer-of-zeste and Trithorax*), um domínio catalítico de lisinas metiltransferases de histonas conhecidas (HUANG et al., 1998).

Presente em proteínas cromossomais de fungos a mamíferos, o domínio SET desempenha um papel importante no desenvolvimento, no câncer, na variação por efeito da posição e no silenciamento gênico centromérico e telomérico (JENUWEIN et al., 1998). Huang et al. (1998) sugeriram que o domínio PR tenha sido derivado do domínio SET e possa atuar na regulação da expressão gênica mediada por modificações da cromatina.

O domínio PR foi inicialmente caracterizado por uma região homóloga de 100 aminoácidos compartilhada entre genes *RIZ*, os quais são codificadores de proteínas ligantes a supressores tumorais de retinoblastoma, e o repressor transcricional PRDI-BF1/BLIMP1, o qual promove a maturação de β -linfócitos (BUYSE et al., 1995; KELLER e MANIATIS, 1991). Este domínio foi posteriormente encontrado no gene relacionado à leucemia mielóide *MDS1-EVI1* (FEARS et al., 1996).

Komai et al. (2009) estudaram o padrão de expressão de Prdm8, uma proteína de domínio PR, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos. Na medula espinhal em desenvolvimento, Prdm8 foi expressa inicialmente em populações progenitoras de interneurônios ventrais e neurônios motores e, posteriormente, em uma subpopulação de interneurônios. Durante o desenvolvimento do cérebro, a expressão de Prdm8 foi observada em neurônios pós-mitóticos na zona intermediária e na placa cortical (KOMAI et al., 2009).

As características associadas à proteína de domínio PR (GB12021; Pfam Superfamília SET) sugerem que esta atue como fator de transcrição durante a neurogênese de *A. mellifera*, regulando a expressão gênica mediada por modificações da cromatina, através da atividade lisina metiltransferases. Uma vez que o GB12021 é mais transcrito no cérebro de rainhas em L4, seu produto

poderia atuar favorecendo o crescimento e a diferenciação celular nesta casta em relação às operárias durante o período larval.

A sequência de aminoácidos referente ao GB12545, mais representada no cérebro de rainhas durante L4 (*Fold-change*: 5,28), apresenta 100% de identidade com o gene da α -catenina de *A. mellifera* e apresenta o domínio conservado conhecido da Família Vinculina [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

Estabelecer contato com células vizinhas e com a matriz extracelular é um pré-requisito de vários processos celulares fundamentais, tais como morfogênese, manutenção da integridade tecidual, cicatrização, crescimento celular e motilidade em organismos multicelulares (COLL et al., 1995). As cateninas são proteínas citoplasmáticas periféricas, inicialmente identificadas em associação a E-caderinas, expressas na superfície basolateral de células epiteliais e concentrada nas junções aderentes (OZAWA et al., 1989; NAGAFUCHI; TAKEICHI, 1989; KEMLER, 1993). As caderinas compreendem uma família de moléculas de adesão celular homofílicas, Ca^{2+} dependentes, que atuam no estabelecimento da integridade tecidual e na polaridade celular (TAKEICHI, 1994).

Peng et al. (2012) demonstraram que, na presença de F-actina, α -catenina ativa vinculina. A ligação direta da α -catenina à vinculina é crítica neste evento, uma vez que uma mutação pontual (α -catenin L344P) não permite a ativação da vinculina. A vinculina é uma proteína de 117 kDa que une adesões da matriz celular mediadas por integrinas e junções celulares realizadas por caderinas (GEIGER, 1979). Em embriões de camundongos, a deficiência de vinculina os torna menores, sendo posteriormente letal devido a importantes defeitos no desenvolvimento do cérebro e do coração (XU et al., 1998). A vinculina apresenta função de supressão de tumores, uma vez que sua alta expressão em algumas células tumorigênicas resulta na diminuição do potencial tumorigênico e metastático (RODRIGUEZ et al., 1992)

De acordo com suas diferentes massas moleculares, as cateninas são classificadas em α -catenina (102 kDa), β -catenina (88 kDa), e γ -catenina (80 kDa). Análises bioquímicas indicam que a β -catenina interage mais diretamente com o domínio citoplasmático da E-caderina em relação à α -catenina (OZAWA; KEMLER, 1992). Em contraste, α -catenina parece controlar a interação com os filamentos de actina (OZAWA et al., 1990). Em *D. melanogaster*, o processo de

diferenciação celular é interrompido quando o gene codificador da α -catenina apresenta uma mutação no sítio de ligação para Armadillo, homólogo da β -catenina neste inseto (CROPP et al., 1994).

Em camundongos, há três α -cateninas que compartilham uma identidade substancial em sua sequência de aminoácidos. A α E-catenina prevalece em tecidos epiteliais, a α N-catenina é restrita a tecidos neurais e a α T-catenina é expressa primariamente em tecidos cardíacos (BUTZ et al., 1994; HERRENKNECHT et al., 1991; MARRS et al., 1993).

A α N-catenina (codificada por *CTNNA2*) foi inicialmente caracterizada por Claverie e colaboradores (1993) a partir de um cDNA humano codificador de uma proteína com 80% de identidade à α E-catenina (*CAP102*), mas contendo uma inserção de 48 aminoácidos. α N-catenina está localizada nas junções aderentes que contornam zonas ativas de sinapses durante todo o desenvolvimento pós-natal do cérebro (UCHIDA et al., 1996; FANNON; COLMAN, 1996).

A expressão de determinados subtipos de caderinas delineaia circuitos neurais específicos, o que indica que os complexos caderina-catenina realizam a adesão entre as membranas pré e pós-sinápticas (SUZUKI et al., 1997; COLMAN, 1997), sugerindo que a α N-catenina atue na estabilização da formação de sinapses durante o desenvolvimento do sistema nervoso central.

Sendo assim, durante a morfogênese do sistema nervoso de castas *A. mellifera*, caderinas atuam em conjunto às α -cateninas, operando como moléculas sinalizadoras da adesão celular decorrente do processo de migração neuronal. Como constatamos que a sequência codificadora destas proteínas é mais transcrita no cérebro de rainhas no quarto estágio larval, o desenvolvimento deste órgão seria beneficiado nesta casta durante o período estudado, uma vez que um nível maior de transcrição deste gene estaria implicado na indução da formação de sinapses.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB15759, super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 5,57), apresenta identidade com o produto hipotético *sodium-coupled monocarboxylate transporter 2-like* de *A. mellifera*. Este GB contém o domínio conservado da Superfamília Simportadores de Sódio [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

Ganapathy et al. (2008) mostraram a expressão de transportadores de monocarboxilato acoplados ao sódio em vários tecidos, incluindo o cérebro. A função destes transportadores é mediar a captação de butirato, propionato e piruvato, os quais são inibidores de histonas desacetilases. Desta forma, os transportadores de monocarboxilato acoplados ao sódio participam da regulação da expressão gênica. Sua maior transcrição no cérebro de rainhas sugere sua participação no controle de genes alvo, conduzindo assim à morfogênese diferencial do órgão, mediante a inibição de desacetilases de histonas, mecanismo amplamente conhecido de regulação da expressão gênica (LEWIN, 2008).

A sequência de aminoácidos referente ao GB18982, mais representada no cérebro de rainhas durante L4 (*Fold-change*: 3,36), codifica a quarta subunidade do complexo promotor da anáfase *A. mellifera*. Esta sequência apresenta o domínio conservado da Superfamília Apc4, cujos membros possuem um longo domínio de repetições WD40 [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)]. Apc4 é uma das maiores subunidades do complexo promotor de anáfase (APC, *anaphase promoting complex*) ou ciclossomo.

O estabelecimento de circuitos neurais durante o desenvolvimento do cérebro requer a formação de sinapses entre os neurônios e, parte essencial deste processo, é a diferenciação pré-sináptica dos axônios. O desenvolvimento de sinapses é regulado por uma via ubiquitina-proteossoma (DIANTONIO e HICKE 2004; JIN e GARNER, 2008). Ubiquitina ligases atuam como reguladoras críticas do metabolismo, do ciclo celular, do reparo de DNA, da sinalização de receptores e em resposta ao estresse (THORNTON e TOCZYSKI, 2006).

O APC é uma ubiquitina ligase E3 composta por, aproximadamente, 11 subunidades em vertebrados e 13 em fungos (GMACHL et al., 2000; YOON et al., 2002). Assim como outras ubiquitina ligases, o APC contém uma pequena subunidade *RING-finger*, chamada APC11, a qual participa da montagem de cadeias multiubiquitinadas na presença da enzima E2 UBC4 (GMACHL et al., 2000; ZACHARIAE et al., 1998; LEVERSON et al., 2000).

Através da ubiquitinação de várias proteínas regulatórias do processo mitótico, o APC controla importantes transições do ciclo celular. Seus principais alvos durante o processo mitótico são as securinas inibidoras da anáfase, cuja

destruição promove a separação das cromátides irmãs, e as ciclinas do tipo B, as quais possibilitam a saída da mitose quando degradadas (PETERS, 2002; HARPER et al., 2002). O APC inicia a reação proteolítica mediando a transferência de resíduos de ubiquitina ativada da enzima conjugadora de ubiquitina E2 aos substratos, originando cadeias multiubiquitinadas. Estas cadeias atuam como sinais de reconhecimento dos substratos para a sua degradação pelo proteossoma 26S (REED, 2003).

A Cdh1 e a Cdc20 são ativadoras específicas do APC, dependendo da presença de sequências específicas denominadas *destruction (D)* e *KEN box*, em APC^{Cdc20} e APC^{Cdh1}, respectivamente (GLOTZER et al., 1991; PFLEGER; KIRSHNER, 2000). Estudos sobre a atuação do APC em células em proliferação mostraram que APC^{Cdh1} e APC^{Cdc20} controlam diferentes fases do ciclo celular. Enquanto APC^{Cdc20} controla a transição do ciclo celular durante o início da mitose, APC^{Cdh1} atua no final da mitose e na fase G1 (PETERS, 2006). No controle da morfogênese de axônios de neurônios pós-mitóticos, APC^{Cdh1} parece regular o padrão e o crescimento axonal (KONISHI et al., 2004), enquanto APC^{Cdc20} atua no final do estágio de desenvolvimento para promover a diferenciação axonal pré-sináptica (YANG et al., 2009).

Konishi et al. (2004) constaram que o *knockdown* de Cdh1 em neurônios granulares do córtex cerebelar estimula o crescimento de axônios, mas não de dendritos, em ratos. Neurônios granulares expressando o inibidor Emi1 do APC ou com Apc11 inibida mostram axônios mais extensos em relação ao controle. Estes resultados sugerem que a atividade ubiquitina ligase do APC^{Cdh1} iniba o crescimento do axônio. Kim e Bonni (2007) constataram que, em contraste ao *knockdown* de Cdh1, o *knockdown* de Cdc20 prejudica seriamente o crescimento a arborização de dendritos em neurônios granulares primários do córtex cerebelar de camundongos, mas não apresenta nenhum efeito, ou efeito reduzido, sobre o crescimento dos axônios.

Camundongos adultos com depleção de APC2 em neurônios excitatórios do prosencéfalo apresentam uma deficiência grave na capacidade de extinguir memórias de medo, fornecendo evidências de que a atividade do APC no prosencéfalo de adultos é requerida na função cognitiva (KUCZERA et al., 2010). Thornton e Toczyski (2006) constataram que a ligação entre Apc4 (quarta subunidade do APC, cuja sequência foi encontrada por nós como

diferencialmente transcrita em nossos experimentos), APC5, APC1, e Cdc23 é interdependente, uma vez que a perda de qualquer subunidade leva a perda de associação entre as demais.

Levando-se em consideração a importância da quarta subunidade na estabilização da montagem do APC e as funções desta ubiquitina ligase já estudadas em outros organismos, pode-se supor a sua atuação no desenvolvimento do cérebro de abelhas. Durante a proliferação celular no cérebro de castas *A. mellifera*, o APC estaria associado a importantes transições do ciclo celular, especificamente à passagem da metáfase para a anáfase e a saída da mitose, além da manutenção na fase G1, através da ubiquitinação de substratos específicos. Uma vez que o gene *APC* é mais transcrito no cérebro de rainhas em L4, haveria uma taxa de proliferação celular mais alta no cérebro desta casta, contribuindo para o maior desenvolvimento desta estrutura em relação à de operárias na mesma fase.

A sequência referente ao GB18914 corresponde à proteína hipotética de *A. mellifera* localizada no LOC726167. Esta sequência contém o domínio conservado Superfamília *zf-LITAF-like*. Membros desta família apresentam um motivo C-XX-C, separado do motivo C-terminal HX-C(P) X-C-X4-G-R por uma região variável de geralmente 25-30 resíduos hidrofóbicos [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

Embora pertença a um dos grupos *zinc ribbon*, este domínio particular foi inicialmente identificado no fator-alfa de necrose tumoral induzido por LPS (LITAF), o qual é produzido em células de mamíferos tratadas com LPS. A região hidrofóbica provavelmente se insere na membrana, reunindo os motivos C-XX-C N- e C-terminal para formarem uma compacta estrutura de ligação Zn^{2+} . Assim, e apesar de ser encontrada em outros invertebrados, como na mosca, resta conhecer a biologia desta molécula, particularmente no referente às suas funções em insetos, e, em especial na neurogênese de abelhas (CHU et al., 2011).

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB19686, super-representada no cérebro de rainhas em L4 (*Fold-change*: 3,34), corresponde à enzima GDP-D-manose 4,6-desidratase (GMDS). Esta sequência possui similaridade de 75% em relação ao CG17947, codificador da mesma enzima em *D. melanogaster*. O GB19686 contém o domínio conservado Superfamília

NABD_Rossmann, uma grande família que compartilha um domínio de ligação a NAD(P)H/NAD(P)⁽⁺⁾. O domínio NADB é encontrado em numerosas desidrogenases de vias metabólicas, tais como a glicólise.

As proteínas fucosiladas desempenham um papel essencial durante o desenvolvimento do organismo. A fucosilação requer GDP-fucose, como doador de fucose, e fucosiltransferases, enzimas que catalisam a transferência de fucose para glicanos ou diretamente para resíduos de serina/treonina de proteínas receptoras (HARRIS e SPELLMAN, 1993). A GDP-fucose é sintetizada no citoplasma, principalmente através de uma reação enzimática catalisada pela GMDS. Em mamíferos, o processo de síntese pode ocorrer também por meio do processo de recuperação de fucose (BECKER; LOWE, 1999). Roos et al. (2002), na busca de enzimas envolvidas no metabolismo de glicanos fucosilados em *D. melanogaster*, sugeriram que, neste inseto, GDP-fucose seja formado exclusivamente a partir de GDP-manose, tendo como catalisadoras a GDP-D-manose 4,6-desidratase e a GDP-4-keto-6-dexosi-D-mannose 3,5-epimerase/4-reductase.

Em seus trabalhos pioneiros, Ginsberg (1960, 1961) elucidou a via enzimática que converte GDP-manose em GDP-fucose. Posteriormente, Yurchenco e Atkinson (1977) mostraram que esta é a primeira rota biossintética para GDP-fucose. GDP-manose é convertido em GDP-fucose pela GMDS, através da oxidação da manose em C-4, seguida da redução de C-6 a um grupo metil, gerando a GDP-4-keto-6-desoximanose. Esta reação continua com a transferência de um hidreto de C-4 para C-6 (OTHS et al., 1990) através da ligação de um cofator, possivelmente o NADP⁺ ou NAD⁺. O intermediário formado é epimerizado em C-3 e C-5, para formar GDP-4-keto-6-desoxi-glucose, o qual é, finalmente, é reduzido por NADH ou NADPH em C-4 para produzir GDP-fucose. Um mecanismo potencial regulatório na via padrão foi inicialmente revelado em estudos de Kornfeld e Ginsberg (1966), os quais demonstraram que GDP-manose 4,6-desidratase foi inibida pelo produto final da via biossintética, GDP-fucose.

Em zebrafish (*Danio rerio*), os progenitores do nervo vago motor de embriões mutantes do tipo *towhead* (*twd*^{*rw685*}) migram além de sua posição normal na superfície do rombencéfalo, durante o desenvolvimento. O locus *twd*^{*rw685*} codifica GDP-D-manose 4,6-desidratase, como já mencionada, uma enzima chave na via de fucosilação. Reduzidos níveis de glicanos fucosilados em *twd*^{*rw685*}

são reestabelecidos através da injeção de mRNA *gmd* nos primeiros estágios de desenvolvimento celular (OHATA et al., 2009).

Com base nos achados científicos supracitados, e considerando-se o processo de neurogênese em *A. mellifera*, GMDS possivelmente atuaria na via de fucosilação de substratos cruciais na indução do reconhecimento de alvos específicos cujos neurônios necessitariam atingir durante o processo de migração neuronal. O fato da sequência que codifica GMDS ser mais transcrita em rainhas do que em operárias, ambas no quarto estágio larval, sugere o favorecimento da neurogênese nas primeiras, uma vez que já foi constatado que o cérebro da casta reprodutora é mais desenvolvido na fase larval (MODA et al., em prep).

A sequência correspondente ao GB19966, super-representada no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Fold-change*: 3,75), apresenta identidade com a proteína predita *Y+L amino acid transporter 2-like* de *A. mellifera* e o CG1607, de *D. melanogaster*. O GB19966 apresenta o domínio conservado Aminoácido Permease.

O sistema Y+L agrupa vários transportadores de aminoácidos e foi identificado pela primeira vez em eritrócitos humanos. Este sistema exibe duas propriedades distintas: ele pode ligar-se e transportar aminoácidos neutros e catiônicos, e sua especificidade varia dependendo da composição iônica do meio (DEVES et al., 1998). FORRAY et al. (1995) demonstraram que o sistema L+Y se liga e transporta vários substratos catiônicos, incluindo L-lisina, L-arginina, L-ornitina e N-monometil-L-arginina, sendo que a afinidade é maior para a L-arginina. A interação do Sistema Y + L com análogos de aminoácidos catiônicos é independente de Na⁺, isto é, a substituição deste íon por K⁺, Li⁺ ou colina não afeta a taxa de transporte de forma significativa. Durante a neurogênese de rainhas *A. mellifera*, a proteína correspondente ao GB19966 poderia atuar no transporte de aminoácidos, favorecendo o desenvolvimento do cérebro de rainhas durante o período larval.

5.2 Sobre *GlcAT-P* e sua transcrição diferencial em cérebro de rainhas e operárias durante o desenvolvimento larval

A sequência de aminoácidos referente ao GB12549, mais transcrita no cérebro de rainhas em relação ao de operárias em L4 (*Microarray Fold-change*:

5,55), apresenta 99% de similaridade à da enzima GlcAT-P de *A. mellifera*. As glicosiltransferases são enzimas que sintetizam oligossacarídeos, polissacarídeos e glicoconjugados através da transferência de uma molécula de açúcar, a partir de um nucleotídeo-açúcar doador, para uma molécula receptora, a qual pode ser um oligossacarídeo, um lipídio ou uma proteína a ser sintetizada [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

A glicosilação é uma importante modificação proteica pós-traducional, principalmente em proteínas da superfície celular, as quais desempenham diversas funções celulares, incluindo o reconhecimento e a adesão (MORITA et al., 2008). No sistema nervoso, vários tipos celulares reconhecem e interagem com outros para formar uma rede neural precisa. Durante este processo, carboidratos expressos em proteínas geram diversidade estrutural de suas proteínas carreadoras, resultando na regulação do reconhecimento, da interação e da migração celular (KLEENE; SCHACHNER, 2004).

A GlcAT-P é uma glucuronosiltransferase, enzima capaz catalisar a transferência de ácido glucurônico a uma unidade receptora (GILBERT, 2003). Esta enzima é estritamente localizada em células neurais, sendo considerada uma enzima-chave na biossíntese do carboidrato HKN-1 (*human natural killer-1*), uma forma sulfatada do ácido glucurônico, caracteristicamente expressa em uma série de moléculas de adesão no sistema nervoso (SCHWARTING et al., 1987). A expressão característica de HNK-1 é observada em rombômeros (KURATANI, 1991), células migrantes da crista neural (BRONNER-FRASER, 1986) de embriões de camundongos em desenvolvimento e em epiblastos de filhotes de aves (CANNING; STERN, 1988).

No peixe *Oryzias latipes*, análises de perda de função de GlcAT-P constataram apoptose massiva tanto na neuroectoderme, durante meados da gastrulação, assim como na região da cabeça, em estágios mais tardios, sendo possível supor que a aderência inadequada entre células com depleção da enzima em estudo tenha conduzido ao processo de apoptose ectópica (ANZAI et al., 2009). Quando a depleção de GlcAT-P foi induzida em camundongos, a consequente perda acentuada de HNK-1 no sistema nervoso destes animais causou a diminuição da aprendizagem espacial e da memória, evidenciando sua importância na manutenção da função neural (YOSHIHARA et al., 2009).

Considerando as funções descritas associadas ao gene *GlcAT-P*, seu produto protéico participaria na via de síntese de moléculas sinalizadoras importantes no processo de reconhecimento de alvos específicos, cujos neurônios necessitariam atingir e aderir durante a migração neuronal. Assim, uma eventual maior atividade da enzima GlcAT-P favoreceria estes processos em rainhas, promovendo um maior e mais rápido desenvolvimento do cérebro durante o período larval desta casta.

O gene *GlcAT-P* foi encontrado mais transcrito em cérebro de rainhas L4 do que no de operárias mediante a hibridação de lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos, e seus níveis de transcrição estimados por PCRq são maiores em cérebro de rainhas durante todo o período de desenvolvimento larval estudado. Como os títulos de HJ durante este período são igualmente bem maiores em rainhas do que em operárias (HARTFELDER; ENGELS, 1998), é possível que a expressão de *GlcAT-P* esteja sob controle deste hormônio morfogenético, cujo papel no controle da expansão neural foi sugerido por Barchuk et al. (2007).

Uma vez que a síntese de HJ encontra-se vinculada à via de sinalização intracelular mediada por Tor (*Target of Rapamycin*; MAESTRO et al., 2009), e a ativação desta é dependente da disponibilidade de nutrientes (MIRON; SONENBERG, 2011; HOWELL; MANNING, 2011), o produto do gene *GlcAT-P* representaria um elo claro entre a alimentação diferencial e a morfogênese do cérebro em larvas de abelhas melíferas comuns.

A ação neurogênica de *GlcAT-P* estaria acompanhada por atividade semelhante do gene *shot* (MODA et al., em prep). Nosso grupo encontrou níveis significativamente bem maiores de seu transcrito em cérebro de rainhas (por PCRq e hibridação *in situ*), e a proteína foi imunolocalizada no citoplasma de células próximas às neurópilas do lobo antenal e próximas a células Kenyon em cérebro de rainhas em L4 (MODA et al., em prep.). Em *Drosophila*, o produto deste gene é requerido na extensão de axônios, na morfogênese dos corpos cogumelares e na proliferação celular (LEE et al., 2000; REUTER et al., 2003).

5.3 Sobre os transcritos mais representados no cérebro de operárias em L4

De acordo com as análises *in silico*, três dos quatro transcritos mais representados no cérebro de operárias em relação ao de rainhas em L4, apresentam número de acesso no Official Gene Set (GB). A sequência predita de aminoácidos referente ao GB10931, mais transcrita no cérebro de operárias em L4 (*Fold-change*: 3,80), corresponde à proteína fosfatase 2C (PP2C). Esta sequência apresenta 64% de similaridade em relação ao CG17746, o qual codifica a mesma proteína em *D. melanogaster*. O GB10931 contém o domínio conservado Superfamília PP2C, uma família de serina/treonina fosfatases dependentes de Mn^{2+} ou Mg^{2+} [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

Décadas de pesquisas sobre o processo de fosforilação reversível de proteínas, realizado por quinases e fosfatases, levaram à conclusão de que este constitui uma das principais vias de sinalização e um mecanismo essencial de regulação em todos os seres vivos. O conceito de fosforilação de proteínas surgiu a partir da observação da necessidade de ATP e de uma enzima conversora, posteriormente denominada fosforilase quinase, para a conversão *in vitro* de uma fosforilase *b* em uma fosforilase *a* (FISCHER; KREBS, 1955; KREBS; FISCHER, 1956; KREBS et al., 1958). Este processo envolve a transferência de um grupo fosfato de uma molécula de ATP para uma fosforilase *b*, resultando na formação de uma fosforilase *a*, uma fosfoproteína (KREBS; FISCHER, 1956; SUTHERLAND; WOSILAIT, 1955).

A modulação da atividade neuronal através de vias extracelulares, como por exemplo, através de fosforilases e fosfatases, é crítica na manutenção e na adaptação da função cerebral (WALAAS; GREENGARD, 1991). Várias vias sinalizadoras estão associadas a alterações da atividade de proteínas-alvo por meio da fosforilação reversível de resíduos serina e treonina. Serina/treonina fosfatases participam ativamente de uma da modulação da atividade neuronal, sendo que todas aquelas conhecidas são expressas no cérebro (PRICE; MUMBY, 1999). Estas fosfatases compreendem três importantes famílias de fosfatases sendo que, uma delas, é a Família de Proteínas Fosfatases Dependentes de Metais. Esta família inclui proteínas fosfatases dependentes de íons manganês/magnésio (Mn^{2+}/Mg^{2+}), os quais desempenham um papel catalítico central (SHI, 2009).

Dentre as proteínas fosfatases dependentes de Mn^{2+}/Mg^{2+} , estão as fosfatases 2C (*protein phosphatase 2C*, PP2C). A PP2C representa uma grande família altamente conservada de proteínas fosfatases, com 16 diferentes genes *PP2C* no genoma humano, os quais originam aproximadamente 22 isoformas distintas (LAMMERS; LAVI, 2007). A função primária de PP2C parece ser a regulação da sinalização em resposta ao estresse, embora também atue na diferenciação celular, crescimento, sobrevivência, apoptose e metabolismo (LU e WANG, 2008). Alguns membros da família PP2C, tais como PP2C α , PP2C β , são candidatos a proteínas supressoras de tumores, enquanto outras, como PP2C δ (também conhecida como Wip1), poderiam contribuir no processo de transformação oncogênica (SHI, 2009).

BARIL e THERRIEN (2006) isolaram mutações em um gene não essencial denominado *alphabet* (*alph*), o qual codifica uma fosfatase serina/treonina da família PP2C intimamente relacionada com as isoformas PP2C α/β em mamíferos. Estudos mostraram que o efeito inibitório de *alph* sobre a sinalização de SAPK (*stress-activated protein kinase*) em *D. melanogaster* ocorre tanto durante o desenvolvimento como sob condições de estresse, tais como estresse oxidativo ou genotóxico (BARIL et al., 2009). Trabalhos anteriores constataram que a má-regulação de SAPK frequentemente conduz a doenças neurodegenerativas, disfunções de imunidade e câncer (MANNING; DAVIS, 2003; ZARUBIN; HAN, 2005).

Durante o desenvolvimento pós-embriônico até o terceiro estágio larval, todas as larvas, independentemente de seu destino, recebem geleia real como alimento. A partir de L3, as larvas destinadas a serem operárias passam a receber uma mistura de geleia real, mel e néctar, ou seja, um alimento mais pobre em carboidratos. Ao mesmo tempo, as futuras rainhas continuam recebendo geleia real. Além disso, as operárias passam a receber menos alimento. Sendo assim, esta alteração do tipo de alimentação representa um evento de estresse, que sofrido particularmente pelas larvas de operárias. Desta forma, a diferença dos níveis de transcrição do gene da PP2C no cérebro de castas *A. mellifera* seria uma das respostas aos diferenciais nutricionais a partir de L3. Em operárias, a maior transcrição de PP2C estaria relacionada à inativação de substratos importantes do processo de neurogênese, através de desfosforilação, culminando

no menor desenvolvimento do cérebro de operárias em relação ao de rainhas na fase larval.

A sequência de aminoácidos predita referente ao GB16661 apresenta identidade à proteína *homeobox* similar a *aristaless (al)*, sendo mais representada no cérebro de operárias em L4 (*Fold-change*: 5,39). Esta sequência apresenta similaridade de 86% ao CG3935, codificador da mesma proteína em *D. melanogaster*, e 87% em relação ao CG2819 (*Pvull-Pstl homology 13, Pph13*). *Pph13*, também conhecido como *munster*, é um gene homeótico localizado no braço esquerdo do cromossomo 2, muito próximo a *aristaless* (MISHRA et al., 2010). O GB16661 possui o domínio conservado Superfamília de Homeodomínios, cujos membros se ligam ao DNA, regulando a transcrição eucariótica dos principais processos de desenvolvimento [NCBI *Conserved Domain Search* (MARCHLER-BAUER; BRYANT, 2004; MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011)].

Os genes *homeobox* codificam fatores de transcrição com papel crucial na embriogênese, os quais atuam criticamente na especificidade do posicionamento das células, controlando a proliferação e a diferenciação destas durante o desenvolvimento embrionário (MACLEAN II; LKINSON, 2010). A regulação inadequada dos genes *homeobox* pode resultar em mudanças drásticas nos programas de desenvolvimento e provocar alterações na identidade dos segmentos corporais. Um exemplo notável é a descoberta de mutações no gene *homeobox Antennapedia*, as quais causam a transformação do segmento da cabeça em um segmento abdominal que apresenta uma perna totalmente articulada no lugar da antena em insetos voadores (POSTLETHWAIT; SCHNEIDERMAN, 1969).

As funções da proteína de homeodomínio *Aristaless (AL)* foram inicialmente descritas em *Drosophila* (CAMPBELL; TOMLINSON, 1998). Mutações em *al*, um gene homeótico altamente conservado durante a evolução, afetam o desenvolvimento de asas, pernas e aristas, apêndices antenais terminais requeridos para funções de audição e detecção de umidade (GOPFERT; ROBERT, 2002; MANNING, 1967; SAYEED; BENZER, 1996). Em vertebrados, há uma variedade de homólogos *al*, os quais foram classificados em três grupos. Ao Grupo I, pertencem genes envolvidos na morfogênese craniofacial e esquelética, o Grupo II contém genes que são expressos no sistema nervoso

central e periférico e o Grupo III reúne genes que mediam diversas funções (MEIJLINK et al., 1999).

Adicionalmente, mutações no gene humano *ARX*, um homólogo de *al* em humanos e camundongos, causam espasmos, retardo mental e epilepsia (STROMME et al., 2002). Defeitos específicos associados à perda de função de *ARX* incluem a migração e a diferenciação anormal de neurônios (FULP et al., 2008). Estudos recentes mostraram que *ARX* está envolvido na proliferação de neuroblastos na zona ventricular neocortical e na diferenciação, proliferação e migração de interneurônios GABAérgicos (KITAMURA et al., 2002). Da mesma forma, o homólogo de *al* em *C. elegans* está envolvido na diferenciação de motoneurônios GABAérgicos, indicando que algumas funções de *ARX/al* possam ser conservadas através das espécies (MELKMAN; SENGUPTA, 2005). Estudos de seu perfil de transcrição revelaram que este gene é necessário para a morfogênese dos rabdômeros e detecção de luz, além de atuar como regulador da expressão gênica (ZELHOF et al., 2003; MISHRA et al., 2010).

As operárias *Apis mellifera* forrageiam em busca de fontes de alimentos usando seu sistema sensorial altamente desenvolvido (VON FRISCH, 1993; SRINIVASAN et al., 2000; ESCH et al., 2001). O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o maior neurotransmissor inibitório de sinapses no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados (MARTIN et al., 2001), sendo que sinapses inibitórias são importantes porque permitem que diferentes efetores reajam de maneiras diversas em relação a um mesmo estímulo. No cérebro de abelhas, neurônios GABAérgicos são amplamente distribuídos por toda a área cerebral (SCHAFER; BICKER, 1986; GRUNEWALD, 1999), e desempenham um importante papel no processamento e na integração sensorial (OKADA et al., 2007; SACHSE; GALIZIA, 2002). Estudos indicam que neurônios GABAérgicos são altamente ativos nos lóbulos ópticos de abelhas forrageiras (KIYA; KUBO, 2010).

A sequência correspondente ao *al* foi encontrada como diferencialmente transcrita no cérebro de rainhas e operárias em L4, sendo mais representada em operárias. Uma vez que operárias *A. mellifera* apresentam várias facetas de olhos compostos e os neurônios GABAérgicos desempenham funções essenciais na memória olfatória e na integração sensorial, a regulação positiva de proteínas relacionadas a *al* poderia permitir o desenvolvimento de estruturas nervosas

fundamentais de importantes características de operárias adultas, como o forrageamento e a comunicação.

Mesmo o cérebro de operárias apresentando um desenvolvimento menor em relação ao de rainhas durante o período larval (MODA et al., em prep.), após este período, ocorre o inverso, e as operárias passam a apresentar esta estrutura mais desenvolvida, possibilitando a realização de tarefas mais diversificadas do que as rainhas durante a fase adulta. O fato de este gene ser mais transcrito em operárias já na fase larval pode estar relacionado ao maior desenvolvimento do cérebro de operárias forrageiras, particularmente da área representada por neurônios GABAérgicos, em fases posteriores.

5.4 Sobre os transcritos diferencialmente representados sem número de acesso em bases de dados

Quatro dos 16 TDR, dois em operárias e dois em rainhas, não foram amplamente analisados *in silico* devido à não associação a nenhum número de acesso no Official Gene Set (GB). Estes são designados por BB160007B10F02.5, BB170027A10E09.5, BB170032B20H12.5 e DB746346. A anotação destas sequências através da ferramenta Artemis mostrou que estão localizadas nas proximidades de ORFs (*Open Reading Frames*). Estas sequências podem corresponder a transcritos com eventuais funções reguladoras (LEWIN, 2008). Amaral e Mattick (2008) demonstraram que os *ncRNAs* regulam a expressão gênica durante o desenvolvimento. Dentre os tipos de *ncRNAs* estão os *miRNAs* (*microRNAs*). Estudos mostraram que a modulação por *miRNAs* tem uma associação significativa com os mecanismos de regulação hormonal de insetos (SEMPERE et al., 2003; LIU et al., 2007; YU et al., 2008). Experimentos realizados com *A. mellifera* apontaram que a expressão de *miRNAs* é espaço-temporalmente controlada e estas moléculas atuam como reguladoras da expressão gênica durante o desenvolvimento da abelha melífera (CHEN, 2010).

Isto sugere que, em determinadas fases do desenvolvimento pós-embriônico (larva e pupa) deste inseto, alguns *miRNAs* se expressam mais que outros, o que garante a regulação diferencial de genes entre as fases. No caso do presente estudo, a alimentação diferencial poderia ser a responsável por induzir a transcrição diferencial de *miRNAs* no cérebro de rainhas e operárias, os quais

controlariam genes alvo com atividades estruturantes, promovendo, assim, o desenvolvimento diferencial do cérebro entre rainhas e operárias de *A. mellifera*.

6 CONCLUSÃO

- Dado que as funções, preditas ou demonstradas em outros sistemas biológicos, dos produtos dos transcritos mais representados em rainhas no quarto estágio larval (L4) estão associadas à proliferação celular, fasciculação e ao estabelecimento de conexões neurais, nossos resultados sugerem que os produtos de tais TDRs (particularmente *GlcAT-P*) são responsáveis pelo maior desenvolvimento do cérebro de rainhas em relação ao de operárias durante o período larval.

Anteriormente, nosso grupo mostrou que o maior desenvolvimento do cérebro em rainhas durante o desenvolvimento larval encontra-se associado à maior atividade de, pelo menos, o gene *shot*. Estes resultados, em conjunto, indicam que *GlcAT-P* e *shot* desempenham um papel fundamental na morfogênese do cérebro de rainhas durante o desenvolvimento larval.

- Por outro lado, a proteína fosfatase 2C, mais transcrita no cérebro de operárias em L4, atuaria em resposta ao estresse ocasionado pela alteração da dieta a partir do terceiro estágio larval. Faria isto regulando negativamente proteínas quinases controladoras da expressão de genes *downstream*, resultando, assim, na redução do ritmo de desenvolvimento do cérebro desta casta durante a segunda parte do período larval.

- *Aristaless*, outro gene mais transcrito no cérebro de operárias em L4 atuaria no desenvolvimento de células dos olhos e de neurônios GABAérgicos (*a1*), caracteres essenciais para o trabalho de operárias adultas forrageiras, indicando que estas características começam a se desenvolver na fase larval.

- Ambos sistemas, o encontrado em rainhas (*GlcAT-P* e *shot*) e o encontrado em operárias (*PP2C* e *a1*), atuando em conjunto, seriam os responsáveis por mediar a ação nutricional sobre o desenvolvimento diferencial do cérebro de castas de *A. mellifera* durante o período larval.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P. P.; MATTICK, J. S., Noncoding RNA in development. **Mamm Genome.**, v.19, p. 454-492, 2008.

ANDERSON, G. J.; CONNOR, W.E.; CORLISS, J.D. Docosahexaenoic acid is the preferred dietary n-3 fatty acid for the development of the brain and retina. **Pediatr Res.**, v. 27, n. 1, p. 89-97, 1999.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANZAI, D. et al. Regulated expression of the HNK-1 carbohydrate is essential for medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. **Glycobiology.**, v. 19, n. 8, p. 868-878, 2009.

ASENCOT, M.; LENSKY, Y. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. **Insect Biochem.**, v.18, p.127-133, 1988.

BARCHUK, A. R.; BITONDI M.M.; SIMÕES Z. L. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. **J Insect Sci.**, v. 2, p. 1, 2002.

BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Dev Biol.**, v. 7, p. 70, 2007.

BARIL, C.; THERRIEN, M. Alphabet, a Ser/Thr phosphatase of the protein phosphatase 2C family, negatively regulates RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. **Dev Biol.**, v. 294, p. 232–245, 2006.

BARTHOLOMEW, C.; IHLE, J. N. Retroviral insertions 90 kilobases proximal to the Evi-1 myeloid transforming gene activate transcription from the normal promoter. **Mol Cell Biol**, v. 11, p. 1820-1828, 1991.

BECKER, D. J., LOWE, J. B. Leukocyte adhesion deficiency type II. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1455, p. 193–204, 1999.

BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **Bee World**, v. 60, p. 24-39, 1979.

BENITEZ, A. L. G. A. **Dietas protéicas sobre a produção de Geléia**. 2000. 140 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Júlio Mesquita, Jaboticabal, 2000.

BENTON, D. The influence of dietary status on the cognitive performance of children. **Mol Nutr Food Res.**, v. 54, p. 1-14, 2010.

BERTRAN, J. et al. Stimulation of system y+-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 89, p. 5606-5610, 1992.

BERTRAND, P.C.; O'KUSKY J.R.; INNIS S.M. Maternal dietary (n-3) fatty acid deficiency alters neurogenesis in the embryonic rat brain. **J Nutr.**, v. 136, p. 1570-1575, 2006.

BOLELI, I.C.; SIMÕES, Z.L.P.; HARTFELDER, K. The stomotogastric nervous system of the honeybee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. **J Morphol.**, v. 236, p. 139-149, 1998.

BOMTORIN, A.D. et al. Differential hind leg development in *Apis mellifera* castes. **Mech Dev.**, v. 126, p. 137, 2009.

BRAND, A.H.; LIVESEY, F.J. Neural stem cell biology in vertebrates and invertebrates: more alike than different? **Neuron.**, v. 70, p. 719-729, 2011.

BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. **Dev Biol.**, v. 115, p. 44-55, 1986.

BUTZ, S. et al. Immunization and affinity purification of antibodies using resin-immobilized lysine-branched synthetic peptides. **Pept Res.**, v. 7, p. 20-23, 1994.

BUYSE, I. M.; SHAO, G.; HUANG, S. The retinoblastoma protein binds to RIZ, a zinc-finger protein that shares an epitope with the adenovirus E1A protein. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 92, p. 4467-4471, 1995.

CAMPBELL, G.; TOMLINSON, A. The roles of the homeobox genes *aristaless* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. **Development.**, v. 125, p. 4483-4493, 1998.

CANNING, D. R.; STERN, C.D. Changes in the expression of the carbohydrate epitope HNK-1 associated with mesoderm induction in the chick embryo. **Development.**, v. 104, p. 643-655, 1988.

CAYRE, M. et al. Understanding the Regulation and Function of Adult Neurogenesis: Contribution from an Insect Model, the House Cricket. **Chem Senses.**, v. 32, p. 385-395, 2007.

CHEN, X. et al. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. **Insect Mol. Biol.**, v.19 ,p.799-805, 2010.

CLAVERIE, J. M. et al. Characterization and chromosomal assignment of a human cDNA encoding a protein related to the murine 102-kDa cadherin-associated protein. **Genomics.**, v. 15, p. 13-20, 1993.

COLL, J. L. et al. Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 92, p. 9161–9165, 1995.

COLMAN, D. R. Neurites, synapses, and cadherins reconciled. **Mol Cell Neurosci.**, v. 10, p. 1-6, 1997.

CRISTINO et al., Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality. **Insect Mol Biol.**, v.15, n.5, p. 703-714, 2006.

CROPP, C.S. et al. Evidence for involvement of *brca1* in sporadic breast carcinomas. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2548–2551, 1994.

DAVIS, R.L. Mushroom bodies, Ca²⁺ oscillations, and the memory gene *amnesiac*. **Neuron.**, v. 30, p. 653-656, 2001.

DENG, Q.; HUANG, S. PRDM5 is silenced in human cancers and has growth suppressive activities. **Oncogene.**, v. 17, p. 4903-4910, 2004.

DEVES, R.; ANGELO, S.; ROJAS, A. M. Glucose transport: a functional approach system Y+L: the broad scope and cation modulated amino acid transporter. **Experimental Physiology.**, v. 83, p. 211-220, 1998.

DIANTONIO, A.; HICKE, L. Ubiquitin-dependent regulation of the synapse. **Annu Rev Neurosci.**, v. 27, p. 223-246, 2004.

DOBBING, J.; HOPEWELL, J. W. Permanent deficit of neurones in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition. **Arch Dis Child.**, v. 46, p. 736-737, 1971.

DOLINOY, D.C.; WEIDMAN, J.R.; JIRTLE, R.L. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. **Reprod Toxicol.**, v. 23, p. 297-307, 2007.

DRAPEAU et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Res.**, v. 16, p. 1385–1394, 2006.

DU, Y. et al. Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase super family. **Cancer Res.**, v. 61, p. 8094-8099, 2001.

DURST, C.; EICHMULLER, S.; MENZEL, R. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. **Behav Neural Biol.**, v. 62, p. 259-263, 1994.

ERIKSSON, P.S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med.**, v. 4, p. 1313-1317, 1998.

ESCH, H.E. et al. Honeybee dances communicate distances measured by optic flow. **Nature.**, v. 411, p. 581–583, 2001.

EXPASY. SIB Bioinformatics Resource Portal (2011). Disponível em <http://expasy.org/tools/>. Acesso em 06/06/2011.

FAHRBACH, S. E.; STRANDE, J. L.; ROBINSON, G. E. Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioural neuroplasticity. **Neurosci Lett.**, v. 197, p. 145-148, 1995.

FAHRBACH, S. E. et al. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honey bee. **Learn Mem.**, v. 5, p. 115-123, 1998.

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annu Rev Entomol.**, v. 51, p. 209-232, 2006.

FANNON, A. M.; COLMAN, D. R. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. **Neuron.**, v. 17, p. 423-434, 1996.

FARRIS, S. M.; SINAKEVITCH, I. Development and evolution of the insect mushroom bodies: towards the understanding of conserved developmental mechanisms in a higher brain center. **Arthropod Struct Dev.**, v. 32, p. 79-101, 2003.

FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S.E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **J Neurosci.**, v. 21, p. 6395-6404, 2001.

FARRIS, S. M. et al. Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. **J Comp Neurol.**, v. 414, p. 97-113, 1999.

FEARS, S. et al. Intergenic splicing of MDS1 and EVI1 occurs in normal tissues as well as in myeloid leukemia and produces a new member of the PR domain family. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 93, p. 1642-1647, 1996.

FISCHER, E.H.; KREBS, E.G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. **J Biol Chem.**, v. 216, p. 121-132, 1955.

FORRAY, M. I. et al. Transport of nitric oxide synthase inhibitors through cationic amino acid carriers in human erythrocytes. **Biochem Pharmacol.**, v. 50, p. 1963-1968, 1995.

FUKUDA, M. T. H.; FRANÇOLIN-SILVA, A. L.; ALMEIDA, S. S. Early postnatal protein mal nutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. **Behav Brain Res.**, v. 133, p. 271-277, 2002.

FULP, C. T., et al. Identification of Arx transcriptional targets in the developing basal forebrain. **Hum Mol Genet.**, v. 17, p. 3740-3760, 2008.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, , v. 287, p. 1433-1438, 2000.

GANESHINA, O.; SCHÄFER, S.; MALUN, D. Proliferation and programmed cell death of neuronal precursors in the mushroom bodies of the honeybee. **J Comp Neurol.**, v. 417, p. 349-365, 2000.

GEIGER, B. A 130 K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells, **Cell**, v. 18, p. 193-205, 1979.

GERBER, B.; TANIMOTO, H.; HEISENBERG. An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 14, p. 737-744, 2004.

GETCHELL, T. V. et al. Temporal profiling of gene expression during neurogenesis and remodeling in the olfactory epithelium at short intervals after target ablation. **J Neurosci Res.**, v. 80, p. 309-329, 2005.

GLOTZER, M.; MURRAY, A. W.; KIRSCHNER, M.W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. **Nature**, v. 349, p. 132-138, 1991.

GLOVER, C. N. et al. Methylmercury Speciation Influences Brain Gene Expression and Behavior in Gestationally-Exposed Mice Pups. **Toxicol Sci.**, v. 110, p. 389-400, 2009.

GOPFERT, M. C.; ROBERT, D. The mechanical basis of Drosophila audition. **J Exp Biol.**, v. 205, p. 1199-1208, 2002.

GRUNEWALD, B. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. **J Comp Neurol.**, v. 404, p. 114–126, 1999.

GMACHL, M. et al. The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 97, n. 16, p. 8973-8978, 2000.

HARPER, J. W.; BURTON, J.L.; SOLOMON, M.J. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. **Genes Dev.**, v. 16, p. 2179-2206, 2002.

HARRIS, R. J.; SPELLMAN, M. W. O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. **Glycobiology**, v. 3, p. 219-224, 1993.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Curr Top Dev Biol.**, v. 40, p. 45-77, 1998.

HERRENKNECHT, K. et al. The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 88, p. 9156–9160, 1991.

HOWELL J. J.; MANNING, B. D. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 22, n. 3, p. 94-102, 2011.

HUANG, S. Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1. **Cell.**, v. 78, p. 9, 1994.

HUANG, S.; SHAO, G.; LIU, L. The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 15933-15939, 1998.

INNIS, S.M. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. **J Nutr.**, v. 137, p. 855-859, 2007.

INNIS, S.M. Perinatal biochemistry and physiology of long chain polyunsaturated fatty acids. **J Pediatr.**, v. 143, p. 1–8, 2003.

JAZWINSKA, A.; RIBEIRO, C.; AFFOLTER, M. Epithelial tube morphogenesis during *Drosophila* tracheal development requires Piopio, a luminal ZP protein. **Nat Cell Biol.**, v. 5, p. 895–901, 2003.

JENUWEIN, T. et al. SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. **Cell Mol Life Sci.**, v. 54, p. 80-93, 1998.

JIN, Y.; GARNER, C. C., Molecular mechanisms of presynaptic differentiation. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 24, p. 237-262, 2008.

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

KELLER, A. D.; MANIATIS, T. Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. **Genes Dev.**, v. 5, p. 868-879, 1991.

KEMLER, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. **Trends Genet.**, v. 9, p. 317–321, 1993.

KEMPERMANN, G. et al. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 103 p. 780-785, 2006.

KENYON, F. C. The brain of the bee. A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the Arthropoda. **J Comp Neurol.**, v. 6, p. 133–210, 1896.

KIM, A. H.; BONNI, A. Thinking within the D box: initial identification of Cdh1-APC substrates in the nervous system. **Mol Cell Neurosci.**, v. 34, p. 281-287, 2007.

KITAMURA, K. et al. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. **Nat Genet.**, v. 32, p. 359-369, 2002.

KIYA, T.; KUBO, T. Analysis of GABAergic and Non-GABAergic Neuron Activity in the Optic Lobes of the Forager and Re-Orienting Worker Honeybee (*Apis mellifera* L.). **PLoS One.**, v. 5, p. 8833, 2010.

KLEENE, R.; SCHACHNER, M. Glycans and neural cell interactions. **Nat Rev Neurosci.**, v. 5, p. 195-208, 2004.

KOMAI, T. et al. Expression of the mouse PR domain protein Prdm8 in the developing central nervous system. **Gene Expr Patterns.**, v. 9, p. 503-514, 2009.

KONISHI, Y. et al. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. **Science.**, v. 303, p. 1026-1030, 2004.

KOZOROVITSKIY, Y.; GOULD, E. Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. **J Neurosci.**, v. 24, p. 6755-6759, 2004.

KREBS, E. G.; FISCHER, E. H. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta.**, v. 20, p. 150–157, 1956.

KREBS, E. G. et al. The muscle phosphorylase b kinase reaction. **J Biol Chem.**, v. 231, p. 73-83, 1958.

KUCZERA, T. et al. The anaphase promoting complex is required for memory function in mice. **Learn Mem.**, v. 18, n. 1, p. 49-57, 2010.

KURATANI, S. C. Alternate expression of the HNK-1 epitope in rhombomeres of the chick embryo. **Dev Biol.**, v. 144, p. 215–219, 1991.

LAMMERS, T.; LAVI, S. Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit. Rev. Crit Rev Biochem Mol Biol.*, v. 42, p. 437-461, 2007.

LANARI, A., et al. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev.**, v. 127, p. 158–165, 2006.

LEE, J.; SEROOGY, K. B.; MATTSON, M. P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **J Neurochem.**, v. 80, p. 539-547, 2002.

LEE, S. *Short stop* is allelic to *kakapo*, and encodes rod-like cytoskeletal-associated proteins required for axon extension. **J Neurosci.**, v. 20, p. 1096-1108, 2003.

LEVERSON, J. D. et al. The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. **Mol Biol Cell.**, v. 11, n. 7, p. 2315-2325, 2000.

LEWIN, B. Regulatory RNA. **Lewin's Genes X**. Sudbury, MA: Jones and Bartlett, 2011, p. 862-877, 2008.

LIU, S., et al. Characterization and expression patterns of let-7 microRNA in the silkworm (*Bombyx mori*). **BMC Dev Biol.**, v.7, p.88, 2007.

LIU, L., et al. The retinoblastoma interacting zinc finger gene RIZ produces a PR domain-lacking product through an internal promoter. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 2984-2991, 1997.

LIU, L. et al. Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. **Nature.**, v. 400, p. 753-756, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONDON, S. E.; REMAGE-HEALEY, L.; SCHLINGER, B.A. Neurosteroid production in the songbird brain: A re-evaluation of core principles. **Front Neuroendocrinol.**, v. 30, p. 302-314, 2009.

LOUA, S.J. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Res.**, v. 1210, p. 48-55, 2008.

LOURENÇO, A. P. et al. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie.**, v. 39, p. 372-385, 2008.

LU, G.; WANG, Y. Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, Los Angeles, v. 35, p. 107-112, 2008.

MACLEAN II, J. A.; WILKINSON, M. F. The RhoX genes. **Reproduction**, v. 140, p. 195-213, 2010.

MAESTRO, J. L.; COBO, J.; BELLÉS, X. Target of Rapamycin (TOR) Mediates the Transduction of Nutritional Signals into Juvenile Hormone Production. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 9, p. 5506-5513, 2009.

MAHONEY, M.B. et al. Presenilin-based genetic screens in *Drosophila melanogaster* identify novel Notch pathway modifiers. **Genetics**, v. 172, p. 2309-2324, 2006.

MALUN, D. Early development of mushroom bodies in the brain of the honeybee *Apis mellifera* as revealed by BrdU incorporation and ablation experiments. **Learn Mem.**, v. 5, p. 90-101, 1998.

MALUN, D.; MOSELEIT, A. D.; GRÜNEWALD, B. 20-Hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee, *Apis mellifera*. **J Neurobiol.**, v. 57, p. 1-14, 2003.

MANNING, A. M.; DAVIS, R. J. Targeting JNK for therapeutic benefit: From junk to gold? **Nat Rev Drug Discov.**, v. 2, p. 554-565, 2003.

MANNING, A. Antennae and sexual receptivity in *Drosophila melanogaster* females. **Science.**, v. 158, p. 136-137, 1967.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, p. 225-234, 2011.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Res.**, 37, p. 205-235, 2009.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 327-331, 2004.

MARRS, J.A. et al. Distinguishing roles of the membrane-cytoskeleton and cadherin mediated cell-cell adhesion in generating different Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase distributions in polarized epithelia. **J Cell Biol.**, v. 123, p. 149-164, 1993.

MARTINEZ, M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids in early human development. **J Pediatr.**, v. 38, p. 120-129, 1992.

MATSUMURA, Y. et al. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I receptormRNA levels in growing chickens. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 60, p. 979-982, 1996.

MEIJLINK, F. et al. Vertebrate aristaless-related genes. **Int J Dev Biol.**, v. 43, p. 651-663, 1999.

MELKMAN, T.; SENGUPTA, P. Regulation of chemosensory and GABAergic motor neuron development by the *C. elegans* Aristaless/Arx homolog *alr-1*. **Development.**, v. 132, p. 1935-1949, 2005.

MICHELETTE, E.R.; SOARES A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v. 24, p. 431-440, 1993.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees: a comparative study.** Cambridge: Harvard University Press, 1974.

MICHENER, C. D. Comparative social behavior of bees. **Annual Review Entomology**, v. 14, p. 299-342, 1969.

MIRON M.; SONENBERG, N. Regulation of translation via TOR signaling: insights from *Drosophila melanogaster*. **J Nutr.**, v. 131, n. 11, 2988-2993, 2001.

MISHRA, M. et al. Pph13 and orthodenticle define a dual regulatory pathway for photoreceptor cell morphogenesis and function. **Development.**, v. 137, p. 2895-904, 2010.

MIZUNAMI, M.; WEIBRECHT, J. M.; STRAUSFELD, N. J.: A new role for the insect mushroom bodies: place memory and motor control. Edited by Beer RD, Ritzman R, McKenna T. **Academic Press.**, p. 199—225, 1993.

MOBBS, P. G. The brain of the honeybee *Apis mellifera* L. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 298, p. 309-354, 1982.

MORITA, I. et al. Expression and Function of the HNK-1 Carbohydrate. **J. Biochem.**, v. 143, p. 719–724, 2008.

MORISHITA, K. et al. Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band 3q26. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 89, p. 3937–3941, 1992.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Tools/>. Acesso em 07/02/2011.

NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M. Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. **Cell Regul.**, v. 1, p. 37-44, 1989.

NIJHOUT, H. F.; WHEELER, D. E. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. **Quart. Rev. Biol.**, v. 57, p. 109-133, 1982.

NILSSON, M. et al. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **J. Neurobiol.**, v. 39, p. 569-578, 1999.

NIVEN, J. E.; GRAHAM, C.M.; BURROWS, M. Diversity and evolution of the insectventral nerve cord. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 53, p. 253–271, 2008.

OHATA, S. et al. Neuroepithelial cells require fucosylatedglycans to guide the migration of vagus motor neuron progenitors in the developing zebrafish hindbrain. **Development.**, v. 136, p. 1653-63, 2009.

OKADA, R. et al. Learning-related plasticity in PE1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. **J. Neurosci.**, v. 27, p. 11736–11747, 2007.

OZAWA, M.; BARIBAULT, H.; KEMLER, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. **EMBO J.**, v. 8, p. 1711-1717, 1989.

OZAWA, M; RINGWALD, M.; KEMLER, R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, p. 4246-4250, 1990.

OZAWA, M.; KEMLER, R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. **J. Cell Biol.**, v. 116, p. 989-996, 1992.

PAGE, R. E.; PENG, C. Y. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Exp. Gerontol.**, v. 36, p. 695–711, 2001.

PATEL, A. et al. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. **PLOS ONE.**, v. 2, p. e509, 2007.

PASCUAL, A.; PRÉAT, T. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. **Science**, v. 294, p. 1115-1117, 2001.

PENG, X. et al. Alpha-catenin uses a novel mechanism to activate vinculina. **J Biol Chem.**, Epub ahead of print, 2012.

PETERS, J. M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. **Mol Cell.**, v. 9, p. 931–943, 2002.

PETERS, J. M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, Vienna, v. 7, p. 644-656, 2006.

PFLEGER, C.M.; KIRSCHNER, M.W. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. **Genes Dev.**, v. 14, p. 655–665, 2000.

PIERRE, J. Apicultura Conocimientos de la Abeja, manejo de la colmena, 2 ed. México: Mundi-Prensa, 2001.

POSTLETHWAIT, J.H.; SCHNEIDERMAN, H. A. A clonal analysis of determination in antennapedia a homoeotic mutant of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 64, p. 176–183, 1969.

PRICE, N. E.; MUMBY, M. C. Brain protein serine/threonine phosphatases. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 9, p. 336-342, 1999.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 12/10/2010.

RACHINSKY, A. et al. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **Gen Comp Endocrinol.**, v. 79, p. 31–38, 1990.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N. Engl. J. Med.**, v. 295, p. 349–353, 1976.

RAVELLI, A. C. J. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet.**, v. 351, p. 173–177, 1998.

REED, S. I. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 855–864, 2003.

REMBOLD, H.; KREMER, J. P.; ULRICH, G.M. Characterization of the postembryonic stages of the female castes of the honeybee, *Apis mellifera* L. **Apidologie.**, v. 11, p. 29-38, 1980.

REUTER, J. E., A mosaic genetic screen for genes necessary for *Drosophila* mushroom body neuronal morphogenesis. **Development.**, v. 130, p. 1203-1213, 2003.

ROOS, C. et al. Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 3168-3175, 2002.

RODRIGUEZ, F. J. L. et al. Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. **J Cell Biol.**, v. 119, p. 427–438, 1992.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, p. 365-386, 2000.

RUDY, J. W.; CASTRO, C. A. Undernutrition during the brain growth period of the rat significantly delays the development of processes mediating Pavlovian trace conditioning. **Behav. Neural. Biol.**, v. 53, p. 307-320, 1990.

SPANNHOFF, A. et al. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. **EMBO Rep.**, v. 12, p. 238-243, 2011.

SACHSE, S.; GALIZIA, C. G. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. **J. Neurophysiol.**, v. 87, p. 1106–1117, 2002.

SAYEED, O.; BENZER, S. Behavioral genetics of thermosensation and hygrosensation in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 6079-6084, 1996.

SCHAFER, S.; BICKER, G. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. **J. Comp. Neurol.**, v. 246, p. 287–300, 1986.

SCHEINER, R; BAUMANN, A.; BLENAU, W. Aminergic Control and Modulation of Honeybee Behaviour. **Current Neuropharmacology**, v. 4, p. 259-276, 2006.

SCHWARTING, G.A. et al. Sulfated glucuronic acid-containing glycoconjugates are temporally and spatially regulated antigens in the developing mammalian nervous system. **Dev Biol.**, v. 120, p. 65-76, 1987.

SCHLINGER, B. A.; SOMA, K.K.; SALDANHA, C. Advances in avian behavioral endocrinology. **The Auk.**, v. 118, p. 283-289, 2001.

SHI, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. **Cell**, v. 139, p. 468-84, 2009.

SEMPERE, L. F., et al. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. **Dev Biol.**, v.259, p.9-18, 2003.

SMYTH, G. K.; SPEED, T. P. Normalization of cDNA microarray data. **Methods**, v. 31, p. 265-273, 2003.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. 4 ed. Washington: Cornell University, 1984.

SOARES, M.P.M. et al. Differential expression of cuticle protein genes during metamorphosis of the honeybee, *Apis mellifera*. **Mech Dev.**, v. 126 , p. 139-140, 2009.

SRINIVASAN, M.V. et al. Honeybee navigation: nature and calibration of the “odometer”. **Science**, v. 287, p. 851–853, 2000.

STRAUSS, R. The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 12, p. 633-638, 2002.

STROMME, P.,et al. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. **Nat Genet.**, v. 30, p. 441-445, 2002.

SUTHERLAND, JR. E. W.; WOSILAIT, W.D. Inactivation and activation of liver phosphorylase. **Nature**, v. 175, p. 169–170, 1955.

SUZUKI, S. C. et al. Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains. **Mol Cell Neurosci.**, v. 9, p. 433-447, 1997.

TAKEICHI, M. The cadherin cell adhesion receptor family: roles in multicellular organization and neurogenesis. **Prog Clin Biol Res.**, v. 390, p. 145-153, 1994.

THORNTON, B.R.; TOCZYSKI, D.P. Precise destruction: an emerging picture of the APC. **Genes Dev.**, v. 20, p. 3069–3078, 2006.

TOMER et al. Profiling by Image Registration Reveals Common Origin of Annelid Mushroom Bodies and Vertebrate Pallium. **Cell**, v. 142, p. 800-809, 2010.

UCHIDA, N. et al. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. **J Cell Biol.**, v. 135, p. 767-779, 1996.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 266-270, 1999.

VON FRISCH, K. The dance language and orientation of bees. 3 ed. Cambridge: **Harvard University**, 1993.

WALAAS, S.I.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 299–349, 1991.

WANG, B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. **Ann Rev Nutr.**, v. 29, p. 177-222, 2009.

WEINSTOCK, G. M., et al. Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, p. 931–949, 2006.

WHEELER, D. E. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. **American Naturalist.**, v. 128, p. 13-34, 1986.

WHEELER, D. E.; BUCK, N.; EVANS, J. D. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect Mol Biol.**, v. 15, p. 597-602, 2006.

WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge: Harvard University, 1971.

WINSTON, M. L. The biology of the honeybee. Cambridge: Harvard University, 1987.

WITHERS, G. S.; FAHRBACH, S. E.; ROBINSON, G. E. Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honey bees. **J Neurobiol.**, v. 26, p. 130–144, 1995.

WITHERS, G. S.; FAHRBACH, S. E.; ROBINSON, G. E. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. **Nature**, v. 364, p. 238–240, 1993.

WU, P. et al. Systematic gene expression profile of hypothalamus in calorie-restricted mice implicates the involvement of mTOR signaling in neuroprotective activity. **Mech Ageing Dev.**, v. 130, p. 602–610. 2009.

YAO, J. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial of everolimus in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors (PNET) (RADIANT-3). **Ann. Oncol.**, v. 21, p. 4-5, 2010.

YOON, H. J. et al. Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. **Curr Biol.**, v. 12, n. 23, p. 2048-2054, 2002.

YOSHIHARA, T. et al. Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta4-galactosyltransferase-II-deficient mice. **J Biol Chem.**, v. 284, n. 18, p. 12550-12561, 2009.

YU, X., et al. The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. **PLoS ONE.**, v.3, p.e2997, 2008.

YU, I.T. et al. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 473-480, 2009.

YURCHENCO, P. D.; ATKINSON, P. H. Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells. **Biochemistry.**, v. 16, n. 5, p. 944-53, 1977.

XU, W.; BARIBAULT, H.; ADAMSON, E. A. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development, **Development**, v. 125, p. 327-337, 1998.

ZACHARIAE, W. et al. Control of cyclinubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. **Science**, v. 282, p. 1721–1724, 1998.

ZARS, T. et al. Localization of the short-term memory in *Drosophila*. **Science**, v. 288, p. 672-675, 2000.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Res.**, v. 15, p. 11–18, 2005.

ZELHOF, A. C. et al. Mutation of the photoreceptor specific homeodomain gene Pph13 results in defects in phototransduction and rhabdomere morphogenesis. **Development**, v. 130, p. 4383-4392, 2003.

ZULU. Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Disponível em: <http://zulu.fmrp.usp.br/beelab> 07/02/2011.

ANEXOS

A) Script utilizado na plataforma R (script)

```
# R SCRIPT FOR NORMALIZATION AND PRINT REPORT OF MICROARRAY
ANALYSIS
setwd ("C:/Documents and Settings/Administrador/Desktop/Resultados
MICROARRAY/SCRIPT NORMAL")
getwd()
library("limma")

targets <- readTargets("targets.txt")

RG <- read.maimages(targets$FileName,
                    columns=list(Rf="CH1I",Gf="CH2I",Rb="CH1B",Gb="CH2B"))

spotTypes <- readSpotTypes("spottype_BeeOligo120406.txt")

RG$genes <- readGAL(galfile="BeeOligo120406.txt")
RG$printer <- getLayout(RG$genes)

RG$genes$Status <- controlStatus(spotTypes, RG)

#PLOT SLIDES BACKGROUND IMAGES

png("graf_redbackground.png")
imageplot(log2(RG$Rb[,1]), RG$printer, low="white", high="red")
dev.off()

png("graf_greenbackground.png")
imageplot(log2(RG$Gb[,1]), RG$printer, low="white", high="green")
dev.off()

#BACKGROUND CORECTION
RGb <- backgroundCorrect(RG, method="normexp", offset=50)

png("graf_RGbackground.png")
plotMA(RGb)
dev.off()

png("graf_RGb_densities.png")
```

```
plotDensities(RGb)
dev.off()
```

```
#NORMALIZATION FOR IMBALANCES IN RED/GREEN DYES (VARIATION IN
SPOT AND SPATION POSITION)
```

```
MA.w <- normalizeWithinArrays(RGb)
```

```
png("graf_MAw.png")
plotMA(MA.w)
dev.off()
```

```
png("graf_MAw_tip.png")
plotPrintTipLoess(MA.w)
dev.off()
```

```
png("graf_MAw_box.png")
boxplot(MA.w$M~col(MA.w$M),names=colnames(MA.w$M))
dev.off()
```

```
png("graf_MAw_densities.png")
plotDensities(MA.w)
dev.off()
```

```
#NORMALIZATION FOR IMBALANCES IN RED/GREEN DYES (VARIATION IN
SPOT INTENSITY AND SPATION POSITION)
```

```
MA.b <- normalizeBetweenArrays(MA.w)
```

```
png("graf_MAb.png")
plotMA(MA.b)
dev.off()
```

```
png("graf_MAbbackground.png")
imageplot(MA.b$M[,1], RG$printer, zlim=c(-3,3))
dev.off()
```

```
png("graf_MAb_tip.png")
plotPrintTipLoess(MA.b)
dev.off()
```

```
png("graf_MAb_box.png")
boxplot(MA.b$M~col(MA.b$M),names=colnames(MA.b$M))
dev.off()
```

```
png("graf_MAb_densities.png")
plotDensities(MA.b)
dev.off()
```

```
save(RG, file="RG.RData")
```

```
save(MA.w, file="MA.w.RData")
save(MA.b, file="MA.b.RData")
```

```
#SET REFERENCE
```

```
design <- modelMatrix(targets, ref="OpL4")
cor <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups=2, spacing=1)
fit <- lmFit(MA.b, design, ndups=2, correlation=cor$consensus.correlation)
```

```
png("graf_MA_fit.png")
plotMA(fit)
abline(0,0,col="blue")
dev.off()
```

```
fit <- eBayes(fit)
```

```
png("graf_qqt_ebayes.png")
qqt(fit$t,df=fit$df.prior+fit$df.residual,pch=16,cex=0.2)
abline(0,1)
dev.off()
```

```
top10 <- topTable(fit, n=350, adjust="fdr")
write.table(top10, "toptable.dat")
```

```
png("graf_MA_toptable.png")
plotMA(fit)
ord <- order(fit$lods,decreasing=TRUE)
top <- ord[1:30]
text(fit$Amean[top],fit$coef[top],labels=fit$genes[top,"Name"],cex=0.8,col="blue")
dev.off()
```

```
png("graf_volcano.png")
volcanoplot(fit,coef=1,names=fit$genes$Name,main="Op X Ra")
dev.off()
```

```
ou
```

```
png(paste("graf_volcano.png"))
volcanoplot(fit,coef=1,names=fit$genes$Name,xlab="Log2(Fold-Change)",
ylab="-log10(P-Value)", pch=16, cex=0.35, main="OpL4 X RaL4")
abline(v=c(-1,1), col="blue")
abline(h=-log(0.05,10), col="red")
dev.off()
```

B) Sequências nucleotídicas presentes nas lâminas de *microarray* que hibridaram diferencialmente amostras de RNA de rainhas e operárias

GB16661-RA

ATCAAGTCCGGGAAGTGAAGATAGGCAATCAACTGGAGTCGGTAAAAGAAAA
CAGCGCAGATATCGTAC

GB11875-RA

AGAATCAACAAACACTTTTGGCAAATGTGACTGCACTAGCTATAGCTATCTTG
CCTTAAGCGTCATTCT

GB10931-RA

AATGCTATTCCACTTAGTCGTGATCATAAACCAACATTGAAGGATGAACGTGA
AAGGATTGAGGCTGCT

DB746346

ACTGTTATCGAACTCTTTGGAACACTTGGAAAAAAGACAAAACGTTTCTCTCT
TCCTCCTTCTACGAG

BB170027A10E09.5

CGATCGATGCTGAGAAAAACACAATTTTTACGACGTAAGGCGAAAGGATAA
GAAGGCGAATAGGGAG

GB19686-RA

TACGTACCTGTGGCCTTGAAAAATCTGTTAAATTTTACCATGCATCAACATCTG
AACTTTATGGCAGGG

GB18982-RA

TCGTGTTAGTCAACAAGAGTTAACATTTATTGCTGAATTCTTACGCGGCTTTGA
TAAACTGAGCCCGG

GB19966-RA

TCCCCATAATCTACATCCTCGCAACCCTTTTTGTAACAATTGTACCCATGTATG
CCAGTCCTGTGGAAA

GB11706-RA

AAAGAACAAGAAGACTCTCAAAGAGATGAGCCATCTTCTCAAGGTGAAACAAA
TTTGATGCGACGAAAT

BB170032B20H12.5

CAAGCTCGCATCATGACAATTAAGGAAGATACTTCAGGAATTGTCTGCTGTTA
TTTGCCTTCTGCTTTC

BB160007B10F02.5

ACCGGCATATCCTCGACCGTCACCTTCTACTTTTTACCTTCGGTCTCCTTCAC
TCGCTGTAC

GB12021-RA

TTAGTGGGTTTCAAACGAAGGGGAATGCTTGTCAATCATTTAGCAAACGACA
TCCAGATGTTGCACCA

GB12545-RA

AGTGCGCAAACCTGGTGAACATGGTGTGATGAATATCCAGAAATAAGTGGTAT
TACTACAGCTCGTGAA

GB12549-RA

GTCGGCCAGAACAATACCGGAACTCACCAGGATGTCGCATACTTTAATGTT
GGTAAAGAATGTTCACT

GB15759-RA

GATCCCAGCCATTCGTTAGAAATTCTTTTTGGGGAATGTCGATTGGAATGGT
GATGACGTGGTTACAC

GB18914-RA

CACCGAATTATTCTGGGCCAGCGAATCTATGCCACAACCACAGACACAATAT
AATGCAAATCCGAATG