

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MÁRCIO TADEU DE OLIVEIRA

**TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL E MORFOGÊNESE DO CÉREBRO ADULTO DE
CASTAS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA***

ALFENAS/MG
2014

MÁRCIO TADEU DE OLIVEIRA

**TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL E MORFOGÊNESE DO CÉREBRO ADULTO DE
CASTAS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde, Área de Concentração: Neurociências e Comportamento. Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

Co-orientadora: Dra. Ana Durvalina Bomtorin

Alfenas/MG

2014

Oliveira, Márcio Tadeu de.

Transcrição diferencial e morfogênese do cérebro adulto de castas de abelhas *Apis mellifera* / Márcio Tadeu de Oliveira - 2014.
76 f. -

Orientador: Angel Roberto Barchuk.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. *Apis mellifera*. 2. Cérebro. 3. Expressão gênica. I. Barchuk,
Angel Roberto. II. Título.

CDD: 612.82

Márcio Tadeu de Oliveira

Transcrição diferencial e morfogênese do cérebro adulto de castas de abelhas *Apis mellifera*

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovada em: 22/08/2014


Prof. Eúca Donato Tomaka
Instituição: FMRP-USP

Assinatura: 

Prof. Lívia Maria Rosetto Moda
Instituição: UNIFAL

Assinatura: 

Prof. Miguel P. Barêche
Instituição: Unifal-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe, pelo apoio integral.

Ao Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, pela oportunidade, paciência, dicas, ensinamentos, confiança, exigência, orientação e incentivo.

À Dra. Ana Durvalina Bomtorin, pela co-orientação, colaboração e dedicação.

À Prof. Dra. Lívia Moda, pela colaboração, dicas e disposição para ajudar.

À Joseana Vieira, Anna Cláudia, Heloísa Gianelli, Vanessa Bonatti, Fábio Barbin, Valdeci Junior, Pedro Zorzaneli, Maíra Bono e Aline Vomero pelo apoio, incentivo e ajuda no laboratório.

À Prof. Dra. Zilá Simões, por permitir o acesso ao Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas da Universidade de São Paulo, Câmpus Ribeirão Preto, onde obtive um enorme aprendizado.

Ao Prof. Dr. Valdemar Junior, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, pela sua dedicação e compreensão.

Aos professores que me ministraram disciplinas durante a pós-graduação.

À Sávio Dutra, Paulo Emílio, Rubens Marcelo, Luiz Aguiar, Rogério Pereira e Marcela Laure pela grande contribuição na obtenção de amostras biológicas.

Aos alunos, professores e técnicos do Laboratório de Biologia Animal Integrativa, Fernando Felicioni, Daniel Galdino, Camila Miranda, Évila Sales, Wesley, Renato, Simone, Rodrigo, Bruno Zavan, Andreinha, Neusa, Izabel, Fernando Ponciano, Marcia Bizinotto, Andrea Amarante, Marisa Ionta e Tomaz Araújo.

Aos mestrandos e doutorandos Murilo Pazin, Junior Ferreira, Marcelo Moraes, Igor Medici, Rodrigo Dallacqua, Claudinéia Costa e Fábio Colombo por terem me auxiliado durante o mestrado.

À Universidade Federal de Alfenas, pelo suporte físico-estrutural e recursos humanos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por ofertar suporte financeiro.

À turma de Farmácia 2013/1 da UNIFAL-MG, na qual fui estagiário docente, onde aprendi muito mais do que expliquei ou ensinei.

*Em uma alma absolutamente livre
De todos os pensamentos e emoções,
Nem mesmo o tigre encontra espaço
Para cravar suas garras afiadas.*

*A mesma brisa passa
Pelos pinheiros da montanha
E pelos carvalhos do vale;
Então, por que produzem notas diferentes?
Nenhum pensamento, nenhuma reflexão,
Vazio perfeito.*

*Porém, algo se move ali,
Seguindo seu próprio curso.*

*Os olhos a vêem,
Mas nenhuma mão pode alcançá-la -*

A lua no riacho.

Nuvem e névoa

São transformações entre o céu e a terra.

Acima delas, brilham eternamente o Sol e a Lua.

A vitória é para aquele

Que, mesmo antes do combate,

Não pensa em si mesmo,

Obedecendo à não-mente da Grande Origem.

Um monge taoísta

RESUMO

Aprendizagem e habilidades relacionadas com a memória são utilizadas pelas abelhas adultas para efetuar a navegação, o forrageamento e outras atividades, que estão associadas com a região central do cérebro, que é relativamente mais desenvolvida nas operárias do que em rainhas. Durante o período larval, no entanto, a alimentação diferencial oferecida as potenciais rainhas promovem o desenvolvimento cerebral mais rápido e a expressão de genes neuronênicos (*ataxin-2*, *cryptocephal*, *dachshund*, *Eph Receptor*, *failed axon connection*, *short stop* e *tetraspanin 5D*). Acontece que, em algum momento do estágio pupal, essa tendência é modificada. Há evidências, de que o cérebro da rainha experimenta taxas relativamente maiores de morte celular, enquanto que, a operária é favorecida por altas taxas de proliferação celular, resultando cérebros específicos nas castas. No presente trabalho, nós relatamos resultados transcriptômicos que possam representar as bases moleculares do desenvolvimento diferencial do cérebro entre as castas. Análises de genoma em larga escala utilizando o microarray de oligonucleotídeos revelam um padrão oposto ao observado durante o período larval, com maiores níveis de transcrição no cérebro de operárias de 324 genes (por exemplo, *mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor*, *minibrain*, *signal peptide peptidase* e *tumbleweed*, todos associados a eventos neurogênicos ou a prevenção da morte celular). Isso sugere que de alguma forma os respectivos produtos dos genes promovam o desenvolvimento diferencial do cérebro de abelhas. MANF, por exemplo, um gene superexpresso no cérebro de operárias codifica uma proteína com um domínio homólogo à SAP Ku70 C-terminal. Uma vez que essa molécula é um inibidor da proteína apoptótica Bax, MANF é um candidato a atuar como um fator anti-apoptótico durante o desenvolvimento cerebral (eventos de extensa morte celular são característicos no cérebro de pupas de rainhas). *Minibrain* codifica uma proteína-quinase envolvida na regulação da divisão celular durante a neurogênese pós-embrionária, e é outro candidato a participar no mecanismo responsável pela inversão da taxa de tamanho do cérebro/ volume corporal entre rainhas e operárias. Além disso, foi avaliado por RT-qPCR o perfil de transcrição das variants A e B do *ecdysone receptor* (mediador da ação dos hormônios edisteróides e provavelmente está envolvido na morte celular diferencial e na proliferação de células do cérebro das castas) em três estágios do desenvolvimento pupal. Nossos resultados sugerem a existência de um limiar hormônio/receptor, onde excesso de hormônio, em rainhas, é desencadeado mais morte

celular do que eventos de proliferação, que por meio da participação de genes efetores, acarretariam as diferenças morfológicas no cérebro adulto entre rainhas e operárias.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Desenvolvimento. Cérebro. Expressão gênica.

ABSTRACT

Learning and memory-related skills that honeybees use for navigation, foraging and other activities are associated with a central region of the brain, the mushroom bodies, which are relatively more developed in workers than in queens. During larval period, however, the differential feeding offered to prospective queens promotes faster brain development and higher expression of several neurogenic genes (*ataxin-2*, *cryptocephal*, *dachshund*, *Eph Receptor*, *fax*, *shot*, *krüppel homolog-1* and *tetraspanin 5D*). It seems that in some point during pupation there happens a shift in this trend. In fact, queen's brain experiences net cell death rates while worker's brain is favored by higher rates of cell proliferation, resulting in caste specific brains. Here we report on transcriptomic results which might represent the molecular underpinnings of the differential brain development between castes. Genome-wide expression analyses using oligonucleotide microarray approach show an opposite pattern to that observed during larval development, with workers' brain with higher transcription levels of 324 genes (e.g., *mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor*, *minibrain*, *signal peptide peptidase*, and *tumbleweed*, all associated to neurogenic events or cell death prevention). This suggests that somehow the respective gene products promote differential development of honeybee brain. MANF, for example, a gene superexpressed in workers' brain, encodes a protein with a domain homologous to SAP Ku70 C-terminal domain. Since this molecule is an inhibitor of apoptotic protein Bax, MANF is a candidate to act as an anti-apoptotic factor during worker brain development (extensive cell death events characterize queens' pupal brain). *Minibrain* encodes a protein-kinase involved in regulating cell division during post-embryonic neurogenesis, and is another candidate to participate in the mechanism responsible for the reversing the brain size/body volume rate between queens and workers. Moreover, we assessed by RT-qPCR the transcription profile of the *ecdysone receptor* (which mediates ecdysteroid action and is probably involved in differential brain cell death/proliferation between castes) variants A and B in three time points during pupal development. Our results suggest the existence of a hormone/receptor threshold above which (hormone excess), in queens, it would be triggered more cell death than proliferation events, which through the differential participation of effector genes, would lead to the morphological differences between adult queens' and workers' brain.

Key words: *Apis mellifera*. Development. Brain. Gene Expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	BIOLOGIA DAS ABELHAS <i>APIS MELLIFERA</i>	11
1.2	O DESENVOLVIMENTO DE CASTAS EM <i>APIS MELLIFERA</i>	12
1.3	SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A NEUROGÊNESE DE <i>A. MELLIFERA</i>	14
1.4	SOBRE O PRESENTE TRABALHO	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	VISÃO GERAL	20
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO	21
3.3	DISSECÇÃO DOS CÉREBROS DE <i>APIS MELLIFERA</i>	24
3.4	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL	25
3.5	PREPARAÇÃO DE SONDAS DE RNA	26
3.6	HIBRIDAÇÃO DAS LÂMINAS DE <i>MICROARRAYS</i> DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	29
3.7	LEITURA DAS LÂMINAS EM SCANNER	30
3.8	BIOINFORMÁTICA	30
3.9	DETERMINAÇÃO DE PERFIS DE TRANSCRIÇÃO DE ECR-A E ECR-B UTILIZANDO PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	31
4	RESULTADOS	33
4.1	IDENTIFICAÇÃO EM ESCALA GENÔMICA DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE REPRESENTADOS ENTRE CÉREBROS DE PUPAS DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE <i>A. MELLIFERA</i>	33
4.2	PERFIL TRANSCRICIONAL DAS VARIANTES A E B DO RECEPTOR DE ECDISTERÓIDES DURANTE O DESENVOLVIMENTO PUPAL DE RAINHAS E OPERÁRIAS DE <i>A. MELLIFERA</i>	39
5	DISCUSSÃO	42
5.1	SOBRE GENES MAIS EXPRESSOS NO CÉREBRO DE OPERÁRIAS PP	42
5.2	O RECEPTOR DE ECDISTERÓIDES E A MORFOGÊNESE DIFERENCIAL DO CÉREBRO EM PUPAS DE CASTAS DE <i>A. MELLIFERA</i>	46
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

Nesta seção são abordadas as referências teóricas da dissertação, envolvendo as características biológicas das *Apis mellifera*, mais especificamente os agentes moleculares envolvidos na morfofisiologia diferencial do cérebro.

1.1 BIOLOGIA DAS ABELHAS *APIS MELLIFERA*

No último século houve uma grande produção científica sobre biologia das abelhas, especialmente a espécie *Apis mellifera*, deste modo, características ecológicas, comportamentais, morfofisiológicas, e mais recentemente, neurobiológicas e moleculares estão sendo desvendadas. Assim, foram gradativamente destituídas as cogitações de que as abelhas eram seres autômatos por possuírem um sistema nervoso relativamente simples. As conclusões dessas pesquisas revelam a importância das abelhas melíferas comuns para a manutenção da agricultura, equilíbrio dos ecossistemas e benefícios à saúde humana (ROBINSON; GROZINGER; WHITFIELD, 2005; DOLEZAL; TOTH, 2014).

As abelhas *Apis mellifera* (Linnaeus 1758) são insetos que apresentam metamorfose completa, denominados holometábolos. Após o período embrionário, que dura aproximadamente três dias, ocorre a eclosão das larvas, as quais passam por quatro mudas. Estas marcam cinco estágios larvais, caracterizados por intensa alimentação e um subsequente crescimento. Depois do período larval, a ontogênese prossegue com uma muda metamórfica, indicando a transição larva-pupa. No período pupal os indivíduos passam por um processo de troca dos tecidos larvais por organizações teciduais adultas. Na fase adulta, as abelhas apresentam condutas de uma sociedade altamente organizada, evidenciadas pela comunicação sofisticada, sobreposição de gerações, divisão de tarefas relacionadas a reprodução e o cuidado cooperativo da prole, o qual as caracteriza como eussociais (VON FRISCH, 1967; WILSON, 1971; WILSON; HOLDÖBLER, 2005; SMITH et al. 2008).

A determinação sexual da *A. mellifera* é haplo-diploide, já que os ovos fertilizados, ou seja, diploides, originam as fêmeas e os ovos não fertilizados, haplóides, os machos (WINSTON, 1987). As larvas fêmeas, dependendo do tipo de alimentação recebida, podem seguir trajetórias de desenvolvimento diferentes, dando origem, eventualmente, a operárias ou

rainhas, difenismo conhecido como castas. Enquanto isso, o macho apresenta somente um tipo morfológico, sendo denominado zangão, que possui a função de fecundar a rainha (BEETSMA, 1979). Características morfofisiológicas permitiram às rainhas serem excelentes reprodutoras. Os membros dessa casta são dotados de um corpo maior e naturalmente são mais longevas do que as operárias. Estas, por sua vez, são especializadas em tarefas relacionadas à manutenção da colônia (WHELLEER, 1986; PAGE; PENG, 2001).

Na colmeia, as larvas que se desenvolverão em operárias estão localizadas em células menores, e as futuras rainhas estão presentes em células maiores (realeiras). Até o terceiro estágio larval, as larvas recebem o mesmo tipo de alimento, a geléia real (PIERRE, 1981). Neste período, considerado crítico para a diferenciação de castas, as operárias adultas continuam alimentando as larvas presentes nas realeiras com geléia real [produto secretado pelas glândulas hipofaríngeas, com auxílio das glândulas mandibulares, que são secretoras de substâncias biológicas ativas (JUNG-HOFFMANN, 1966; WILSON, 1965)]. As larvas que serão operárias recebem um composto nutritivo com geléia real, mel e pólen, denominado “geléia de operária” (MICHENER, 1969). Durante o estágio pupal, as abelhas passam por reorganizações morfológicas evidenciadas pela diferenciação da cabeça, do tórax, abdome e também da coloração dos olhos e escurecimento da cutícula. A pupa inicia-se com a coloração dos olhos na cor branca, prossegue com a cor rosa, marrom e por fim, pretos. Em seguida, ocorre o escurecimento da cutícula até a emergência da abelha adulta (WINSTON, 1987).

1.2 O DESENVOLVIMENTO DE CASTAS EM *APIS MELLIFERA*

Qualquer larva selecionada para o papel de uma futura rainha é alimentada com grandes quantidades de geleia real. Em contraste, as larvas destinadas a tornar-se operárias são alimentadas com uma mistura de geleia real, mel e pólen, denominada “geleia de operária” (MICHENER, 1969; JUNG-HOFFMANN, 1966). A geleia real, que é rica em carboidratos, vitaminas do complexo B, minerais, proteínas, lipídios e sais minerais, difere da “geleia de operária” pela quantidade de secreções glandulares. Por exemplo, o teor de carboidratos da geleia real é quatro vezes maior do que o oferecido às larvas de operárias (ASENCOT; LENSKY, 1976, 1988; ver também LEIMAR et al. 2012).

A disponibilidade da sequência do genoma de *A. mellifera* (HONEY BEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006) facilitou as abordagens genômicas para investigar

fatores moleculares e mecanismos subjacentes à organização social e estabeleceu firmemente a abelha como um organismo modelo para tais estudos (ROBINSON; GROZINGER; WHITFIELD, 2005). A partir de resultados de análise da expressão gênica diferencial durante o período crítico do desenvolvimento de operárias e rainhas, obtidos mediante hibridação de *microarrays* de cDNA, nosso grupo propôs o primeiro modelo para a diferenciação de castas em *A. mellifera* (BARCHUK et al. 2007; 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 corpora allata (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). Outro órgão sensível, 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 *Target of Rapamycin* (TOR), o que aumenta os níveis de síntese de hormônio juvenil (HJ) nos CA (ver recente trabalho de CAMERON; DUNCAN; DEARDEN, 2013, que mostra a super-expressão de genes da via de síntese em rainhas), 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). De maneira interessante, estudos feitos em *Blattella germanica* mostraram uma relação funcional entre atividade de *Tor* e síntese de HJ (MAESTRO; COBBO; BELLES, 2009), o qual explicaria os elevados níveis de expressão de *tor* em larvas de rainhas e os simultâneos altos títulos deste hormônio.

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; ver também BOMTORIN et al. 2012; MEDVED; HUANG; POPADIC, 2014). Além disso, o HJ é, provavelmente, o controlador da expansão do desenvolvimento neural, especificamente dos corpos cogumelares, resultando em um cérebro proporcionalmente maior em rainhas

quando comparado ao de operárias na fase larval (MODA et al. 2013). A regulação da síntese de HJ em abelhas pode ter ainda a participação de outra via, a 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.

Mais de uma via de regulação parece, assim, participar dos processos de diferenciação de castas em *A. mellifera*. Em 1974, REMBOLD; LACKNER; GEISTEBECK, em uma corrida pela identificação do “determinador” de castas, conseguiram isolar da geleia um composto pequeno e hidrofílico, que poderia ser o responsável pelo desenvolvimento de rainhas. De maneira interessante, recentemente foi demonstrado que as diferenças nos tipos de geleia oferecida a larvas de rainhas e operárias estendem-se ao conteúdo de uma molécula que atualmente está sendo bastante estudada, o miRNA, uma molécula pequena e hidrofílica. As geleias de rainhas e operárias possuem diferentes perfis quantitativos e qualitativos destas moléculas, participando, também, na regulação dos eventos de desenvolvimento que levam à diferenciação de castas (SHI et al. 2012; GUO et al. 2013).

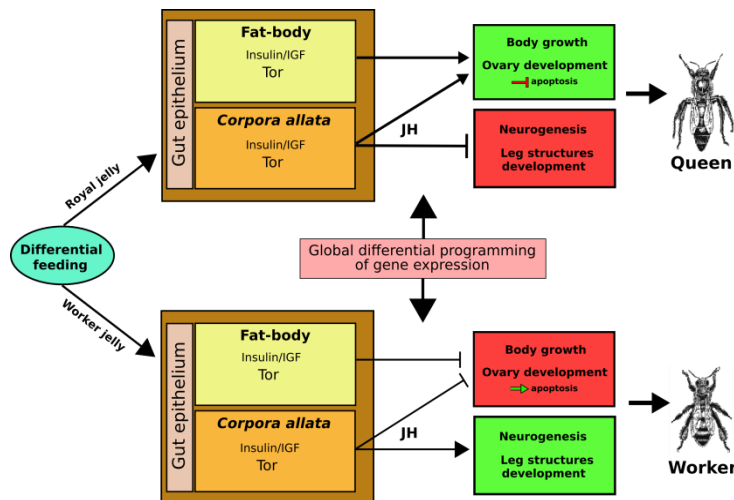


Figura 1 - Modelo de trabalho para o estudo da diferenciação de castas em *Apis mellifera*.

Nota : A espessura da seta indica a intensidade de ação aos fatores relacionados.

Fonte: BARCHUK et al. 2007.

As estruturas cerebrais de abelhas são bem conhecidas, com os primeiros relatos sobre elas correspondentes ao século XIX (KENYON, 1896; ver também MOBBS, 1982). Dentre as espécies que não possuem neurogênese adulta (FAHRBACH; STRANDE; ROBINSON, 1995), as abelhas são insetos com um sofisticado sistema de orientação espacial, apresentando memória e capacidade de aprendizado desenvolvidos (MENZEL, 1985; MENZEL; GREGGERS; HAMMER, 1993; HORRIDGE, 2009; SRINIVASAN, 2011).

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, 1956). 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; GRAHAM; BURROWS, 2008).

O cérebro de *A. mellifera* consiste em três regiões principais: o deutocérebro, o tritocérebro e o protocérebro. 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 (SNODGRASS, 1956; SUZUKI, 1975). 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 (FAHRBACH, 2006). Os lóbulos ópticos recebem e processam informação sensorial a partir dos olhos compostos. O sistema de química sensorial é representado pelos lóbulos antenais posicionados ventralmente aos lóbulos do protocérebro. As saídas principais dos lóbulos antenais para o cérebro central são por neurônios de projeção visando os corpos cogumelares e um subcompartimento do protocérebro, o corno lateral (BRANDT et al. 2005). 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 é formado por aproximadamente 170.000 células Kenyon, neurônios intrínsecos dessa estrutura (KENYON, 1896). As suas arborizações dendríticas originam neuropilas dispostas concentricamente formando os cálices medial e lateral. Cada cálice é dividido em três subcompartimentos, denominados lábio, colar e anel basal (BRANDT et al. 2005), os quais recebem impulsos sensoriais processados das regiões óptica e olfatória do cérebro e impulsos mecanossensoriais da cabeça. Projeções axonais das células de Kenyon originárias dos cálices projetam feixes para o mesencéfalo, formando assim o pedúnculo e os lobos verticais e medial dos copos cogumelares (STRAUSFELD, 2002).

A estrutura dos corpos cogumelares é primeiramente determinada pela morfologia das células Kenyon, que são os neurônios intrínsecos 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. 2013).

A proliferação neural nos corpos cogumelares inicia-se no primeiro estágio larval, pela divisão celular simétrica de neuroblastos (MALUN, 1998; FARRIS et al. 1999). 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. As células Kenyon movem-se, de maneira preferencial, dorsalmente e externamente, como uma consequência das diferentes posições dos grupamentos de neuroblastos relativas à neuropila 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, 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 estágios larvais, e caracterizados por maiores taxas de proliferação em rainhas (MODA et al. 2013). Neste último trabalho, nosso grupo, utilizando PCRq em Tempo Real, hibridação *in situ*, ensaios de proliferação celular, e técnicas imunohistoquímicas, demonstrou que a

expressão do gene *shot* é decisiva para a neurogênese diferencial em larvas favorecendo às futuras rainhas. Este gene é importante para o aumento da extensão de axônios, sendo ele mais expresso em rainhas no quarto estágio larval, o que pode explicar a existência de uma área maior ocupada por neuroblastos em rainhas nos últimos estágios do desenvolvimento larval em relação a operárias (MODA et al. 2013). Outro gene, o *GlcAT-P*, que também é mais expresso em rainhas, pode ser responsável pela sinalização de alvos específicos, fato importante para os neurônios no processo de migração. Deste modo, acredita-se que *shot* e o *GlcAT-P*, em conjunto, executam função fundamental no desenvolvimento do cérebro de rainhas na fase larval (FREIRE, 2012; MODA et al. 2013).

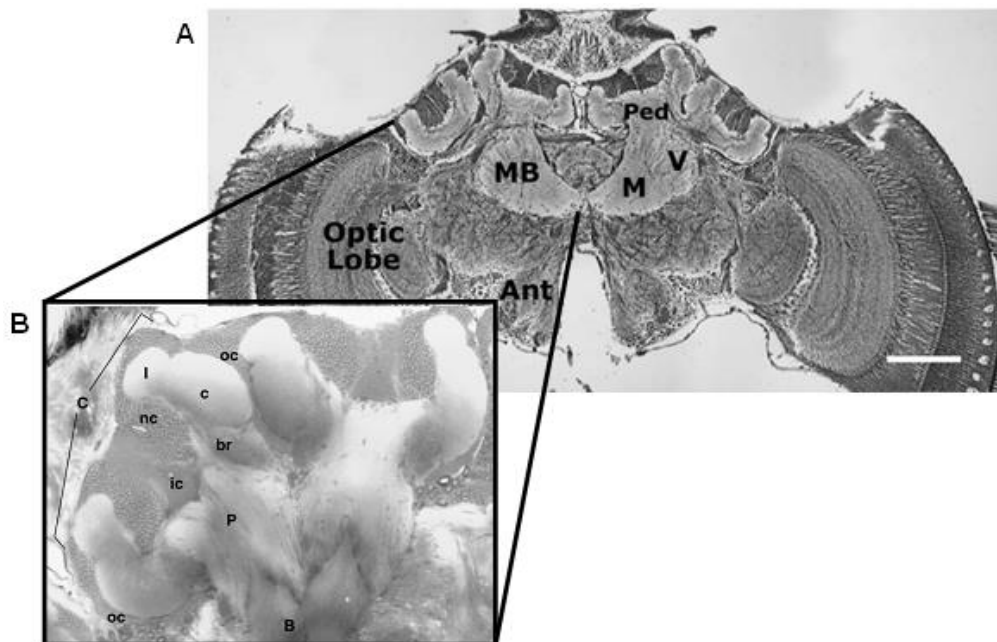


Figura 2 - A) Fotomicrografia com corte transversal do cérebro adulto de abelha, com poucas manchas de corantes, destacando os corpos cogumelares (MB) e o pedúnculo (Ped) (FAHRBACH, 2006), Escala: 200 μ m. B) Seção transversal dos corpos cogumelares do cérebro de abelha na fase adulta (WITHERS; FAHRBACH; ROBINSON, 1995).

Nota: Abreviações: lóbulo da antena (Ant), lóbulo medial (M), pedúnculo (Ped), lóbulo vertical (V), cálice (C), lábio (l), colar (c), anel basal (br), células compactas internas (ic), células não compactas (nc), células compactas externas (oc), pedúnculo (p), lóbulo β (B). Lóbulo α não consta na microfotografia.

Fonte : 2A FAHRBACH, 2006; 2B WITHERS; FAHRBACH; ROBINSON, 1995

1.4 SOBRE O PRESENTE TRABALHO

Mas, como é amplamente conhecido, é o cérebro de operárias adultas que é proporcionalmente maior que o de rainhas (MICHENER, 1974). Um cérebro mais desenvolvido permite às operárias realizar a variedade de deveres necessários para manter a saúde da colônia: o forrageamento, o cuidado das larvas, a limpeza do ninho e a proteção, etc. Assim, se o período larval é caracterizado por um maior desenvolvimento cerebral e uma heterocronia, ambos favorecendo às rainhas, hipotetizamos que a necessária inversão das proporções do cérebro entre rainhas e operárias deve acontecer durante o desenvolvimento pupal. Neste sentido, o fim da proliferação de neuroblastos e o início dos eventos apoptóticos, ao redor da metade do período pupal, são eventos que coincidem com o típico aumento dos títulos de ecdisteróides durante o período pupal de insetos (HARTFELDER & ENGELS, 1998; GANESHINA et al. 2000). Ambos eventos parecem, assim, obedecer ao mesmo sinal hormonal, e foi sugerido que com a participação dos mesmos fatores da progressão do ciclo celular, as proteínas retinoblastoma e p53 (GANESHINA et al. 2000). Mais ainda, foi demonstrado que a exposição prematura de pupas, de maneira exógena, ao hormônio 20-hidroxiecdisona provoca uma redução na atividade mitótica dentro dos centros de proliferação dos corpos cogumelares das abelhas. Além disso, foi observada, por meio de marcadores celulares, a antecipação da morte celular no cérebro das pupas com o pico de hormônios ecdisteróides (GANESHINA et al. 2000; MALUN et al. 2003). Estes resultados, em conjunto, sugerem a existência de uma cascata de reações promovida pelo ambiente hormonal característico do período de desenvolvimento pupal (HARTFELDER & ENGELS, 1998), que levaria à morfogênese diferencial do cérebro adulto entre rainhas e operárias mediante a geração de padrões casta-específicos de expressão gênica.

2 OBJETIVOS

Nessa seção são apresentados os objetivos da dissertação, separados por um alcance mais abrangente (geral) e de menor escala (específicos) para responder as questões relacionadas ao desenvolvimento diferencial do cérebro ente castas de *A.mellifera*.

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral identificar mediadores moleculares dos diferenciais hormonais no desenvolvimento diferencial do cérebro em pupas de castas de *A. mellifera*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar transcritos diferencialmente representados (TDRs) em cérebros de rainhas e operárias no desenvolvimento pupal (Pp), utilizando *microarray* de oligonucleotídeos;
- b) Determinar os níveis de transcrição do gene codificador das variantes A e B de EcR, receptor de ecdisteróides de *A. mellifera* (*AmEcR*), e potenciais mediadores da ação hormonal sobre a morte celular em cérebros pupais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nessa seção está descrita como foi desenvolvido o trabalho, sendo abordada a obtenção da amostra e as técnicas moleculares utilizadas.

3.1 VISÃO GERAL

Para a identificação de genes potencialmente envolvidos na mediação molecular do desenvolvimento diferencial do cérebro pupal entre castas realizamos um *screening* molecular utilizando a abordagem da hibridação de lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos com amostras de RNA provenientes de cérebros de pupas (Pp) de rainhas e operárias. Este estágio é caracterizado por picos de ecdisteróides (PINTO et al. 2002), hormônios responsáveis pelos extensivos eventos de morte celular em cérebros de abelhas que levam à diferenciação morfológica entre castas. Esta abordagem nos permitiu obter uma lista de genes diferencialmente representados entre cérebros de rainhas e operárias, os quais foram analisados *in silico*. Amostras de cDNA sintetizadas a partir de RNA obtidos de diversas fases do desenvolvimento pupal foram utilizados para avaliar o comportamento transcricional do gene *EcR* (receptor de ecdisteróides; ver Figura 3).

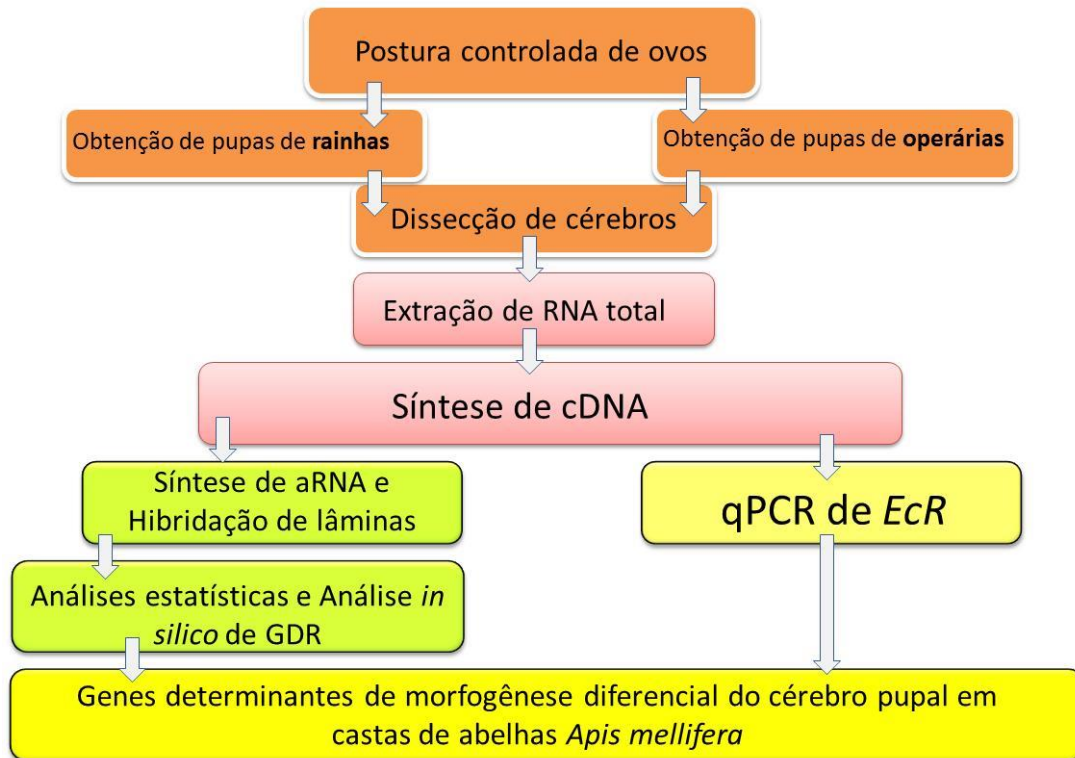


Figura 3 - Fluxo experimental. GDR: genes diferencialmente representados.
 Fonte : Do autor

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de cérebro de pupas de rainhas e operárias foram obtidas a partir de abelhas em desenvolvimento coletadas de colônias do Apiário Experimental da UNIFAL-MG e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Inicialmente foram coletadas amostras contendo um *pool* de 15 cérebros de pupas de operárias e 10 cérebros de rainhas no estágio Pp (olho rosa – Tabelas 1 e 2) de desenvolvimento para realizar a hibridação de lâminas de *microarray* de DNA. Seguidamente, foram coletadas as amostras de cérebro de Pw, Pdp e Pbm de rainhas e operárias (ver Tabelas 1 e 2), com as quais realizamos a determinação dos níveis de transcrição por RT-qPCR.

Para a obtenção de larvas com idade controlada, aprisionamos a rainha numa gaiola de exclusão durante aproximadamente 6h e transferimos, com espátula, larvas recém-eclodidas (L1) para realeiras artificiais (Figura 4) contendo uma gota de geleia real. Para a obtenção de pupas de operárias, as larvas eram deixadas em células de operárias até o estágio desejado (como em BARCHUK et al. 2002).

Tabela 1 – Características utilizadas para agrupar as larvas (L) e pupas (P) de operárias de abelhas *A. mellifera* africanizadas antes da emersão para a vida adulta. A duração dos estágios larvais durante o desenvolvimento pré-imaginal refere-se às horas após eclosão. O estágio L5 é subdividido de acordo com a fase de alimentação (F1, F2 e F3) e pela fase de tecelagem do casulo (S1, S2 e S3). A fase pré-pupal é representada pela sigla PP.

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	
PP1	comprimento tibia-tarso = 1,4 a 1,99 mm	145-160
PP2	comprimento tibia-tarso = 2,0 a 2,6 mm	160-180
PP3	comprimento tibia-tarso > 2,6 mm	180-190
Pw	Pupa de olho branco	190-230
Pp	Pupa de olho rosa	230-250
Pdp	Pupa de olho rosa-escuro	250-265
Pb	Pupa de olho marrom	265-305
Pbl	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica leve	305-330
Pbm	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica intermediária	330-370
Pbd	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte	370-390

Fonte: Modificado de Michelette e Soares, 1993.

Tabela 2 - Características utilizadas para agrupar as larvas (L) e pupas (P) de rainhas de abelhas européias, *Apis mellifera carnica*, antes da emergência para a vida adulta. O estágio L5 é subdividido de acordo com a fase de alimentação (F1, F2 e F3) e pela fase de tecelagem do casulo (S1, S2 e S3). A fase pré-pupal é representada pela sigla PP.

Fase	Caracterização
Ovo	Embriões de 0 a 72 horas
L1	peso – 0,0001 a 0,00045 g
L2	peso – 0,00035 a 0,0015 g
L3	peso – 0,0013 a 0,007 g
L4	peso – 0,0038 a 0,044 g
L5F1	peso – 0,035 a 0,090 g
L5F2	peso – 0,091 a 0,180 g
L5F3	peso – 0,181 a 0,260 g
L5S1	célula operculada, larva com intestino cheio
L5S2	célula operculada, larva com intestino semi cheio
L5S3	célula operculada, larva com intestino vazio
PP1	comprimento tíbia-tarso = 1,6 a 2,19 mm
PP2	comprimento tíbia-tarso = 2,2 a 2,8 mm
PP3	comprimento tíbia-tarso > 2,9 mm
Pw	Pupa de olho branco
Pp	Pupa de olho rosa
Pdp	Pupa de olho rosa-escuro
Pb	Pupa de olho marrom
Pbl	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica leve
Pbm	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica intermediária
Pbd	Pupa de olho marrom com pigmentação torácica forte

Fonte: Modificado de Rembold et al. 1980



Figura 4 - Imagens mostrando a sequência da transferência de larvas para a realeira artificial.
Fonte: www2.persocom.com.br/api-df/cba.htm

Os respectivos quadros com favo contendo as pupas selecionadas ou as barras com realeiras eram colocados em suportes e com o auxílio de tesoura e pinças de ponta fina as pupas foram retiradas dos alvéolos e colocadas em uma placa de Petri contendo um papel filtro umedecido com solução salina (NaCl 0,9%), preparando-as para a dissecação.

3.3 DISSECÇÃO DOS CÉREBROS DE *APIS MELLIFERA*

A dissecação dos cérebros das pupas foi feita em solução salina (NaCl 0,9 %) com água DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase) estéril e com o auxílio de lupa, pinças, alfinetes e placa para dissecação. As pupas eram fixadas com alfinetes na placa e com as pinças eram retiradas a cutícula da cabeça da abelha, seguidamente eram separados e descartados os lobos ópticos, as antenas e o aparelho bucal. Abaixo dos ocelos localiza-se o cérebro, o qual era dissecado e transferido para um tubo Eppendorf com 50 microlitros solução salina (NaCl 0,9%) e mantido em gelo. Após a dissecação dos cérebros, eram adicionados 200 microlitros de TRIzol® (Invitrogen) em cada tubo os quais eram armazenados a – 80 °C até o momento da extração do RNA total.

3.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total dos cérebros das pupas foi extraído utilizando o reagente TRIzol®, obedecendo o protocolo do fabricante (Invitrogen), descrito a seguir. Após o descongelamento, as amostras com os cérebros foram homogeneizadas com o auxílio de um pistilo e o volume total de reagente foi completado para 500 µL, o material foi deixado em temperatura ambiente por cinco minutos, em seguida foram adicionados 100 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados por 15 segundos e deixados por três minutos a temperatura ambiente. As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a rotação de 12000 g a 4°C. Seguidamente, foram observadas em cada tubo três fases: uma com coloração vermelha, outra aquosa e uma fase intermediária. A fase aquosa (que contém o RNA) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 250 µL de álcool isopropílico e agitados por inversão. As amostras foram incubadas overnight a -20°C e centrifugadas a 12000 g por 1 h a 4°C. Após a centrifugação foi possível observar o RNA precipitado (*pellet*) e o sobrenadante, que foi removido. O *pellet* de RNA foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% e as amostras agitadas por inversão, centrifugadas a 7500 g a 4°C por cinco minutos. Para ressuspender o RNA, o sobrenadante foi descartado, a amostra com o RNA foi colocada no termobloco a 55 °C por 10 minutos e ressuspensa em 20 µL de água DEPC.

Para a hibridação das lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos, o RNA obtido foi purificado usando o kit RNA Cleanup (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. O volume de cada amostra foi completado para 100 µL de água. Foram adicionados 350 µL de *Buffer RLT* e mais 250 µL de etanol a cada amostra, homogeneizando com o auxílio da pipeta. As amostras foram transferidas, imediatamente, para colunas do kit (*RNeasy Mini spin column*), e centrifugadas por 15 segundos a 10000 rpm a 25°C. A centrifugação resultou em um filtrado, que foi descartado e a coluna foi novamente inserida no tubo coletor, adicionando-se 500 µL do *Buffer RPE* à coluna e depois as amostras foram centrifugadas por 15 segundos a 10000 rpm a temperatura ambiente para lavar a membrana contida na coluna. O filtrado resultante foi descartado e a coluna reinserida no tubo coletor. Então, as colunas contendo as amostras foram inseridas em novos tubos e foram adicionados 50 µL de água livre de RNase centrifugando por 60 segundos a 10000 rpm a temperatura ambiente, para eluir o RNA. As quantificações de RNA foram realizadas em

espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) em comprimento de onda igual a 260 nm.

3.5 PREPARAÇÃO DE SONDAS DE RNA

Para preparar as amostras de RNA dos cérebros de operárias e rainhas para as análises de hibridação de lâminas de *microarray* de oligonucleotídeos, foi realizada a amplificação do RNA total fazendo-se o uso do *Amino Alkyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit* (Ambion). A transcrição reversa para sintetizar a primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 micrograma de RNA total, 1 μL de T7 Oligo(dT), adicionando água livre de nuclease para completar 12 μL , essas amostras foram agitadas por cinco segundos e em seguida foram incubadas por 10 minutos a 70°C em termobloco.

A temperatura ambiente foi preparado o *Reverse Transcription Master Mix*. Os reagentes e os volumes utilizados para cada amostra foram: 10X *First Strand Buffer* (2 μL), *dNTP Mix* (4 μL), *RNase Inhibitor* (1 μL) e *ArrayScript* (1 μL). Estes reagentes foram agitados no *vortex*, centrifugados rapidamente e colocados em gelo. Em seguida, foram transferidos 8 μL da mistura anterior para cada amostra de RNA, e o conjunto centrifugado brevemente. As amostras foram incubadas a 42°C por duas horas, centrifugas brevemente e colocadas em gelo.

Para sintetizar a segunda fita de cDNA, foi realizada a preparação do *Second Strand Master Mix*, onde o volume e o reagente foram adicionados da seguinte forma: 63 μL de *Nuclease-free Water*, 10 μL de 10X *Second Strand Buffer*, 4 μL de *dNTP Mix*, 2 μL da DNA polimerase e 1 μL da RNase H. Os reagentes foram centrifugados por cinco segundos e colocados no gelo. O volume final dos reagentes (80 μL) foi adicionado a cada amostra de RNA e o conjunto centrifugado por cerca de cinco segundos. Após isto, os tubos com as amostras foram incubados por duas horas no termociclador, e em seguida, foram colocados no termobloco a 16°C.

Para purificar o cDNA das amostras, foi necessário o aquecimento antecipado de água livre de RNase a 55°C por cerca de dez minutos. Cada tubo com a amostra recebeu 250 μL de *cDNA Binding Buffer* e depois o conjunto foi homogeneizado manualmente. Cada amostra foi transferida para uma coluna *cDNA Filter Cartridge* e centrifugada por um minuto a 10000x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi recolocada no tubo

coletor. Em seguida, foram adicionados 500 μL de *Wash Buffer* em cada coluna, sendo centrifugadas por um minuto a 10000 g em temperatura ambiente. O líquido resultante foi descartado e a coluna reinserta no tubo coletor vazio e centrifugada por um minuto para retirar resíduos de *Wash Buffer*. A coluna foi transferida para o *cDNA Elution Tube* e com o objetivo de otimizar a eluição do cDNA, foram adicionados 9 μL de *Nuclease-free Water* pré-aquecida (50-55°C) no centro da coluna, que ficou em temperatura ambiente por cerca de dois minutos e, em seguida, foi feita a centrifugação por 90 segundos a 10000 x g. Após isto, foram colocados mais 9 μL de *Nuclease-free Water* no centro da coluna, a qual ficou por dois minutos em temperatura ambiente e, na sequência, foi centrifugada por 90 segundos a 10000 x g. O cDNA ficou armazenado em freezer a -20°C.

Para a realização da transcrição *in vitro* (AMINO ALLYL-MODIFIED aRNA) foi preparado o *IVT Master Mix*, adicionando os volumes e os reagentes a seguir: 3 μL de aaUTP (50mM), 12 μL de ATP, CTP, GTP *Mix* (25mM), 3 μL de UTP *Solution* (50mM), 4 μL de T7 10X *Reaction Buffer* e 4 μL de T7 *Enzyme Mix*. Os reagentes foram misturados delicadamente no *vortex* e a mistura foi centrifugada por cinco segundos. O volume final da mistura (26 μL) do *IVT Mix* foi adicionado em cada amostra, sendo homogeneizado com a pipeta. Depois de uma rápida centrifugação (*spin*), as amostras foram colocadas para incubar por 14 horas (*overnight*) a 37°C em banho-maria. Após a incubação, foram adicionados 60 μL de *Nuclease-free Water* em cada amostra de aRNA, obtendo um volume final de 100 μL , a qual foi agitado no *vortex* e deixadas no freezer a -20°C.

Para a purificação do aRNA, foi necessário adicionar 350 μL de *aRNA Binding Buffer* a cada amostra de aRNA. Após isto, foram adicionados 250 μL de etanol absoluto (100%) a cada amostra, homogeneizando com a pipeta. A mistura resultante foi transferida para o centro da coluna *aRNA Filter Cartridge* e centrifugada por um minuto a 10000 g. O sobrenadante foi descartado e a coluna reinserta no tubo coletor vazio. Em cada coluna foram adicionados 650 μL de *Wash Buffer*, a qual foi centrifugada por um minuto a 10000 g. O sobrenadante foi descartado e a coluna reinserta no tubo coletor e centrifugada por um minuto com o objetivo de remover resíduos de *Wash buffer*. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores, onde foram adicionados 100 μL de *Nuclease-free RNA*, pré-aquecida, no centro da coluna. Depois de dois minutos em temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada por 90 segundos a 10000 g. A concentração do aRNA foi aferida em Nanodrop (ND 1000), e o aRNA foi armazenado no freezer a -20°C.

Depois de ser realizada a quantificação do aRNA, foi feita a reação de ligação do aRNA ao corante. Para essa etapa é necessário já ter centrifugados os corantes Cy3 e Cy5

(Amersham Pharmacia Biotech, GE) por um minuto a 10000 rpm. O corante foi preparado com antecedência a ligação ao aRNA. Assim, 11 μL de DMSO foram adicionados a um tubo de corante reativo (Cy3 ou Cy5), agitando no *vortex*. Os corantes ressuspensos foram armazenados no escuro em temperatura ambiente por 60 minutos.

A quantidade apropriada de aRNA foi transferida para um tubo de 1,5 mL e levada ao *SpeedVac* para o secamento. Foram adicionados 9 μL de *Coupling Buffer* ao tubo com o aRNA seco, misturando delicadamente no *vortex*. Para seguir adiante na reação de ligação ao corante, foi necessário incubar os tubos no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente.

Para terminar a reação, foram adicionados 4,5 μL de 4M *Hydroxylamine*, agitando no *vortex*, e incubando a mistura por 15 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Por último, foram adicionados 5,5 μL de *Nuclease-free Water*, elevando o volume final para cada amostra para 30 μL . Seguidamente, realizamos a purificação do aRNA corado. Nesta fase foi removido o excesso de corante do aRNA marcado. No início da purificação foram adicionados 105 μL de aRNA *Binding Buffer* a cada amostra de aRNA. Na sequência, foram adicionados 75 μL de etanol, homogeneizando com a ponteira da pipeta. Em seguida, a mistura foi transferida para o centro da coluna *Labeled aRNA Filter Cartridge* e centrifugada por 60 segundos a 10000 x g. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi reinsertada no tubo coletor. Em cada coluna foram adicionados 500 μL de *Wash Buffer*, depois foi feita a centrifugação por 60 segundos a 10000 x g. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi reinsertada no tubo coletor. Para eliminar resíduos de *Wash Buffer*, a coluna foi centrifugada por mais 60 segundos. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e nestes foram adicionados 10 μL de *Nuclease-free Water*, pré-aquecida, no centro da coluna. Depois de dois minutos em temperatura ambiente a coluna foi centrifugada por 90 segundos a 10000 x g. Este último passo foi repetido, sendo utilizado mais 10 μL de *Nuclease-free Water* pré-aquecida, obtendo um volume final de 20 μL .

3.6 HIBRIDAÇÃO DAS LÂMINAS DE *MICROARRAYS* DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

As lâminas de *microarrays* (BeeOligo 120406; Functional genomics, University of Illinois) foram adquiridas por meio do Dr. G. E. Robinson (Illinois University, Urbana, USA). As mesmas apresentam 28.800 seqüências, dispostas em 48 quadrantes, contendo 13.440 *spots* em réplicas duplas, que correspondem a 16 mil genes do genoma da *Apis mellifera*, sendo que cada um dos oligonucleotídeos é composto por 60-69 nucleotídeos (mers) e foram sintetizados pela Invitrogen (San Diego, CA).

Para fixar os oligonucleotídeos às lâminas, estas foram, inicialmente, umidificadas em vapor de água Milli-Q, secadas em bloco térmico por aproximadamente cinco segundos e expostas a luz ultravioleta (6000 x 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$). Em seguida, foram lavadas para a remoção dos oligonucleotídeos que não foram fixados. A primeira lavagem foi feita agitando as lâminas por dois minutos em solução de SDS 0,2 %. Então, foram feitas duas lavagens em água bidestilada estéril e, por último, em isopropanol. A seguir, as lâminas foram centrifugadas por três minutos a 2000 rpm para secagem.

Após essa etapa, as lâminas foram incubadas em solução de pré-hibridação (10mL de formamida, 2,5 mL de solução de *Denhardts* 100X, 16,6 mL de SSC 20x, 0,5 mL de SDS 10 % e 0,25 mL de tRNA 10 mg/mL, completou-se com água Milli-Q para o volume final de 50 ml) a 42 °C por, no mínimo, 45 minutos. Depois de retiradas da solução de pré-hibridação, as lâminas foram lavadas por mais duas vezes em água bidestilada, uma vez em isopropanol e centrifugadas por três minutos a 2000 rpm. As lâminas foram mantidas a 55 °C até o momento da hibridação e incubadas a 42 °C por aproximadamente 22 horas. Para retirar o excesso de solução de hibridação e reduzir o *background*, as lâminas foram lavadas duas vezes por dois minutos a temperatura ambiente em cada uma das soluções SSC 2X, SDS 0,1 %; SSC 0,5X, SDS 0,01%; SSC 2X; SSC 0,1X e, após, houve a realização de mais duas lavagens em água, para posterior centrifugação por dois minutos a 2000 rpm.

Para reduzir as diferenças entre cada tipo de fluoróforo, as amostras foram hibridadas às lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos em *dye-swap*. Desta maneira, na primeira lâmina foi hibridado o RNA extraído do cérebro de operárias marcado com Cy3 e o obtido do cérebro de rainhas com Cy5 e, na segunda lâmina, foi feito o inverso, operárias, Cy5 e rainhas, Cy3. Foram hibridadas quatro lâminas, sendo que, em duas foram colocados 6 μg de RNA do cérebro de operárias e 6 μg de RNA do cérebro de rainhas, e, em outras duas lâminas

foram colocados 20 µg de RNA do cérebro de rainhas e 20 µg de RNA do cérebro de operárias.

3.7 LEITURA DAS LÂMINAS EM SCANNER

As lâminas hibridadas foram escaneadas no Scanner Axon GenePix 4000B, instalado no Laboratório de Biologia Animal Integrativa, LABAInt (Molecular Devices; [MCT/FINEP/CT-INFRA –PROINFRA-MG]), com 10 µm de resolução, utilizando filtros para Cy3 com *laser* de 532 nm de comprimento de onda (verde) e, para Cy5, de 635 nm (vermelho). Para a quantificação das imagens de hibridação foi utilizado o GenePix Pro Software 7.0. Após um *preview*, foram feitas as leituras das lâminas para a captura dos dados (DATA SCAN). Antes disto, foi realizada a correção manual do ruído intrínseco da lâmina (*background*). Após o término da leitura, a imagem de cada lâmina foi salva em extensão TIFF e seguidamente usada na extração numérica (valores de intensidade de sinal de cada spot). Os resultados foram salvos em txt e arquivados em uma pasta para análises no programa R.

3.8 BIOINFORMÁTICA

Os dados numéricos correspondentes às intensidades de hibridação em cada *spot* (genes) foram submetidos a normalizações e análises estatísticas mediante o uso do Pacote Limma no Programa R (R Development Core Team, 2010). Limma é um pacote do R para análise de dados de experimentos de expressão gênica diferencial com *microarrays* por meio de modelos lineares empregando Estatística Bayesiana Empírica para produzir resultados estáveis, mesmo quando o número de matrizes é baixo (SMYTH, 2003). O *script* (Anexo 1) que foi utilizado nas análises estatísticas foi baseado em Barchuk et al. (2007).

A normalização de dados de hibridações de *microarrays* visa ajustá-los para eliminar alterações decorrentes de variações da técnica. Inicialmente, os dados foram pré-processados para a correção do *background* para evitar valores negativos ou intensidades iguais a zero, para o qual foi utilizado o método “*normexp*”, adicionando aos valores de *background*

corrigidos em 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 baixas em direção a zero. As normalizações das próprias lâminas, assim como entre elas, foram processadas utilizando “print tip loess” para corrigir os efeitos de localização e dos corantes. Cada M-valor foi normalizado pela subtração do valor correspondente ao grupo da curva de Loess (SMITH, 2003).

Para a construção das matrizes de análise, foram utilizados os valores de operárias como referência. Então, as duplicatas foram corrigidas, totalizando 14.400 *spots* 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, utilizando-se Estatística Bayesiana Empírica. Finalizando essa etapa, foi produzido um gráfico *volcano* com os transcritos diferencialmente representados (TDRs) entre as amostras. Os genes correspondentes aos TDRs entre o cérebro de rainhas e operárias no estágio Pp foram analisados *in silico* usando a versão 4.0 do genoma de *A. mellifera* (HONEY BEE GENOME CONSORTIUM, 2006) e o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, ALTSCHUL, 1997). Adicionalmente a sequência de mRNA foi submetida ao programa de busca por domínios conservados no banco de dados do NCBI – Conserved Domain Search (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.9 DETERMINAÇÃO DE PERFIS DE TRANSCRIÇÃO DE ECR-A E ECR-B

As análises dos níveis relativos das variantes transcricionais A e B do gene codificador do receptor de ecdisteróides (*EcR*) foram realizadas por médio de RT-qPCR em Tempo Real utilizando-se SYBR® Green no sistema 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems), do Laboratório de Biologia Animal Integrativa do Departamento de Biologia Celular e Tecidual e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG [MCT/FINEP/CT-INFRA-PROINFRA-01/2008 LABSBIOEX (0336/09)]. Foram analisadas amostras de cDNA de *pools* de cérebros de operárias e rainhas em três estágios do desenvolvimento pupal (Pw, Pdp e Pbm). De cada estágio foram analisadas 3 amostras biológicas em triplicata técnica (3 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas). O gene *rpl32* (número de acesso NM 001011587),

foi usado como controle. A sequência dos *primers* utilizados (Mello et al. em preparação) encontram-se na Tabela 3. As condições de reação foram as seguintes: em cada poço foi colocado 7,4 µL de água MilliQ estéril, 10 µL de SYBR® Green Real Time PCR Master Mixes, 0,8 µL de primer-F (10 µM), 0,8 µL de primer-R (10 µM) e 1 µL do cDNA da amostra do cérebro, totalizando 20 µL por poço. A reação foi programada com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 58 °C (*rpl32*, EcR-A e EcR-B) e um ciclo final de 15 segundos a 95 °C.

As análises dos níveis de transcritos foram feitas de acordo com a metodologia de $\Delta\Delta C_t$ comparativo formulada por PFAFFL (2004). Foram considerados resultados de transcritos diferentes entre as castas quando $p < 0,05$ (test t).

Tabela 3 - *Primers forward (F) e reverse (R)* utilizados nos experimentos da qPCR em tempo real .

Nome do <i>primer</i>	Sequência	
	Foward	Reverse
EcR-A	5' CCAACAGCAACAACGGCTAC 3'	5' AAAGAGCCAGGCTGCGACAA 3'
EcR-B - F	5' ACAGTGTGCCAACGGTCAC 3'	5' AAAGAGCCAGGCTGCGACAA 3'
Rpl32	5' CGTCATATGTTGCCAACTGGT 3'	5' TTGAGCACGTTCAACAATGG 3'

Fonte: Do autor

4 RESULTADOS

Nessa sessão são descritos os resultados das análises de microarranjos de oligonucleotídeos, mais especificamente dos transcritos diferencialmente expressos entre cérebros de pupas de rainhas e operárias de *A. mellifera*. Além disso, estão descritos os resultados dos perfis de transcrição das variantes A e B do gene EcR durante o período pupal de desenvolvimento de *A. mellifera* em castas femininas.

4.1 IDENTIFICAÇÃO EM ESCALA GENÔMICA DE TRANSCRITOS DIFERENCIALMENTE REPRESENTADOS ENTRE CÉREBROS DE PUPAS DE OPERÁRIAS E RAINHAS DE *A. MELLIFERA*

Visando a realização de um *screening* genômico para a identificação de transcritos diferencialmente representados nos cérebros das castas que possam ser os responsáveis por mediar o desenvolvimento diferencial do cérebro na fase pupal, foram realizados experimentos de hibridação de lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos com amostras de RNA de cérebros de operárias e rainhas na fase Pp do desenvolvimento pupal (ver Tabelas 1 e 2). Foram processadas quatro lâminas, duas com 6 µg de RNA do cérebro de operárias e 6 µg de RNA do cérebro de rainhas, e, duas lâminas com 20 µg de RNA do cérebro de rainhas e 20 µg de RNA do cérebro de operárias (Figura 8). Dísparas quantidades de RNA usadas em hibridações deste tipo permitem aumentar a probabilidade de identificar tanto genes de baixa expressão (usando grandes quantidades de RNA e saturando os genes de alta expressão) quanto genes de alta expressão (usando pequenas quantidades de RNA e perdendo os sinais dos genes de baixa expressão).

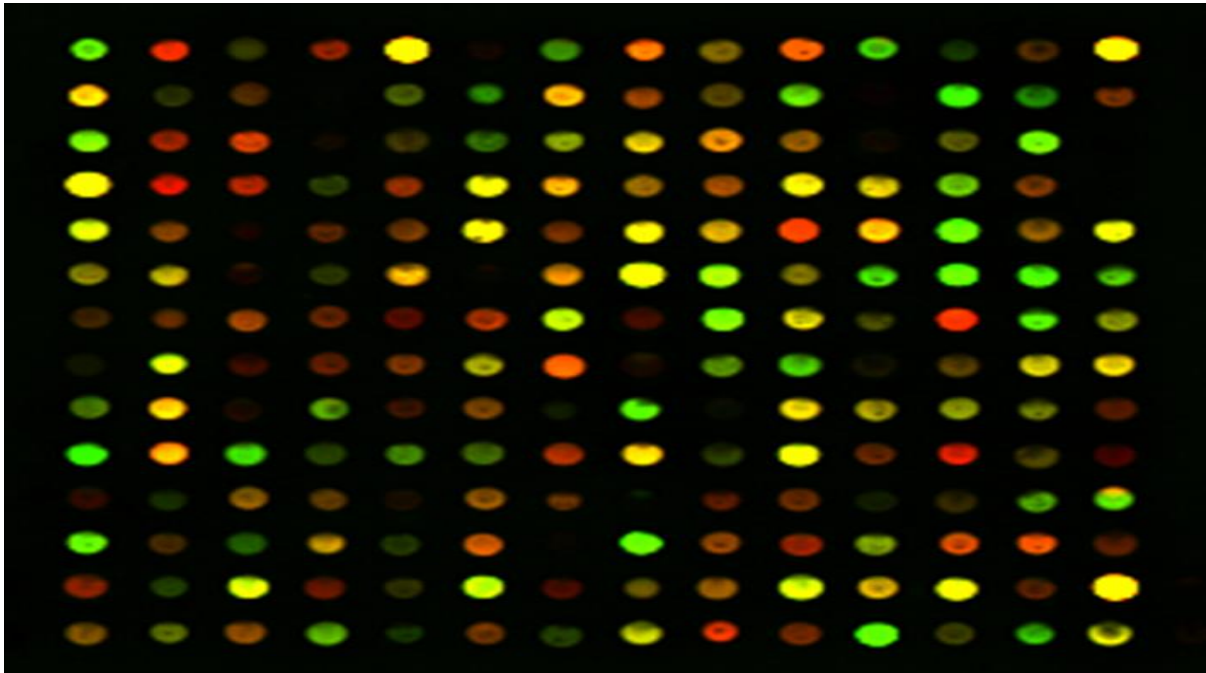


Figura 5 - Exemplo de quadrante de lâmina de oligonucleotídeos de DNA hibridada e escaneada. Os *spots* coloridos representam os eventos de hibridação positivos. Verdes: sobre-expressão em rainhas. Vermelho: sobre-expressão em operárias. Branco/amarelo: expressões equivalentes.

Fonte : Do autor

Usando o pacote Limma em R (e um *script* previamente testado, ver em Anexos), foi possível avaliar a qualidade das hibridações, o que pode ser observado no exemplo da figura 6. Este gráfico mostra os valores de contraste de níveis de expressão, onde, valores positivos são para operárias (valor referencial) e negativos para rainhas. No mesmo gráfico foram observados os genes de referência (controles internos), por exemplo, os codificadores de proteína actina. Normalmente, essa proteína é expressa em níveis semelhantes em ambas castas. O valor ótimo de expressão diferencial para o controle interno é zero, e no gráfico observa-se que genes de referência estão próximos de zero, por exemplo, o *ELF 3*, *Actina* e o *EF1a*, além de possuírem valores altos de expressão (intensidades, A, entre 14 e 16). Outros parâmetros de qualidade avaliados por controles nas lâminas foram os spots vazios e os que receberam solução salina (em Figura 6, ver, por exemplo, pontos verdes e vermelhos). Estes mostraram intensidades entre 9 e 11, como esperado. Comportamentos semelhantes tiveram spots com oligonucleotídeos correspondentes a genes controles exógenos (por exemplo, Lac Z e Elemento P). Todos os parâmetros de qualidade considerados foram avaliados positivamente, indicando alto grau de qualidade dos experimentos de hibridação.

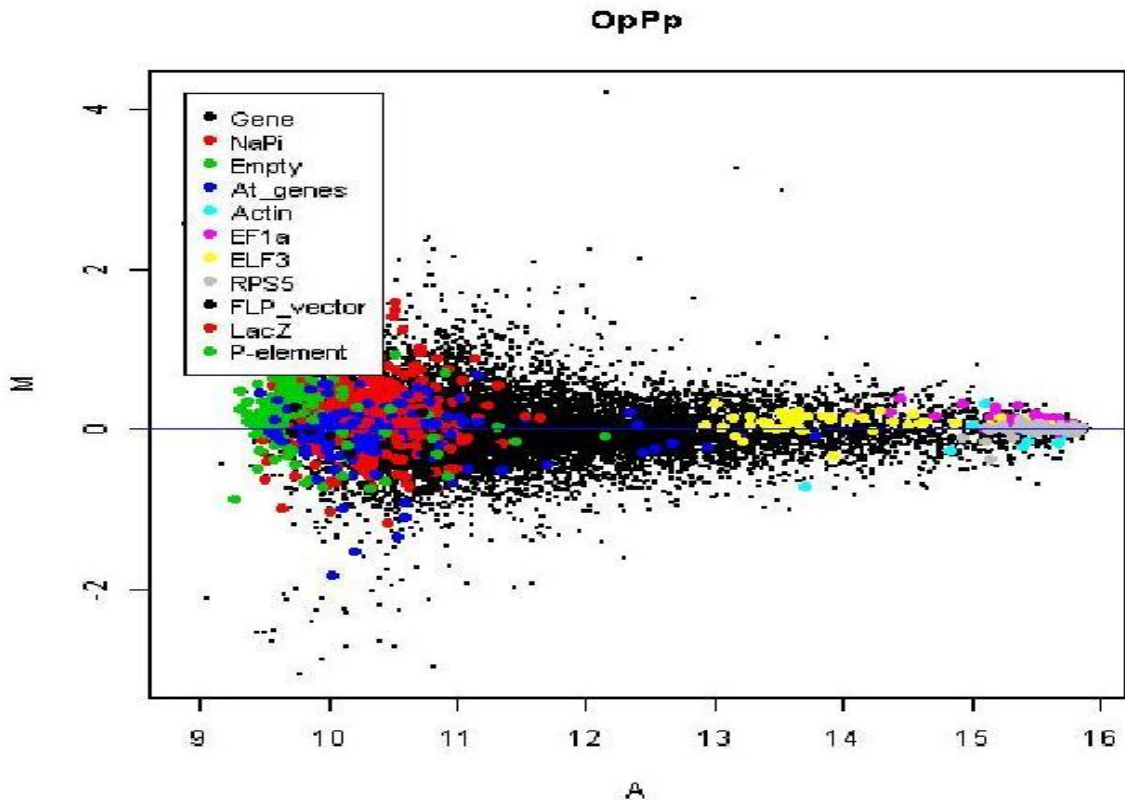


Figura 6 – Gráfico de dispersão de M-valores versus A-valores das hibridações (MA-Plot). Nota: onde OpPp significa que as operárias são as referências. M-valor é igual a $\log_2(R) - \log_2(G)$, e A-valor é igual a $\frac{1}{2} \cdot [\log_2(R) + \log_2(G)]$. Os spots vazios no gráfico são representados pela palavra Empty e os “cheios” com pontos de coloração preta e menores que os genes de referência (coloridos).

Fonte: Do autor

A análise dos valores numéricos após normalizações intra e inter-lâminas resultou em uma lista de 324 sequências diferencialmente transcritas ($p < 0,05$), todas mais representadas em amostras de cérebro de operárias (Pp). Destas 324 sequências, 167 possuem ortólogos em *Drosophila melanogaster* (ver Anexo 2). A partir destas sequências e considerando o nível de transcrição diferencial (Fold-Change $> 1,50$) e a literatura disponível, cinco genes diferencialmente representados em cérebros de fêmeas de *A. mellifera* no estágio Pp chamaram a atenção e foram selecionados para análises *in silico*: Os codificadores da ATP sintase β , da peptidase do peptídeo sinal, da proteína minibrain, do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF), e da proteína tumbleweed (Tabela 4).

Tabela 4 - Características dos cinco genes selecionados mais transcritos em cérebros de operárias Pp.

Official_set_ID	Scaffold	Proteína codificada em Drosophila	Pfam database (Domínio Conservado)	Fold-Change
GB13596	Group14:7	ATP synthase - beta	ATP Synthase	2,419
GB19273	Group11:14	Signal Peptide Peptidase	Peptidase_A22B	1,964
GB20129	GroupUn146	Minibrain	Domínio proteino-quinase	1,759
GB10060	Group 6.74	Mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor	Superfamília Armet	1,69
GB18839	Group13:7	Tumbleweed	Superfamílias: RhoGAP; proteino-quinase C1	1,643

Fonte: Do autor

O fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF) pertence a um grupo de proteínas denominadas fatores neurotróficos (NTFs; com Domínio ARP/ARMET, rico em arginina) que atuam como reguladoras da vida e da morte de neurônios durante o desenvolvimento, sendo que cada proteína específica pode agir em um determinado conjunto populacional de neurônios (LINDHOLM; SAARMA, 2010). Além disso, os NTFs podem regular a diferenciação, maturação, migração, reparação de lesões neuronais e a plasticidade neuronal (THOENEN et al. 1995; HUANG; REICHARDT, 2001; AIRAKSINEN; SAARMA, 2002). MANF (membro da superfamília ARMET) foi identificado por meio do cultivo de linhagens de astrócitos mesencefálicos ventrais em ratos (PETROVA et al. 2003).

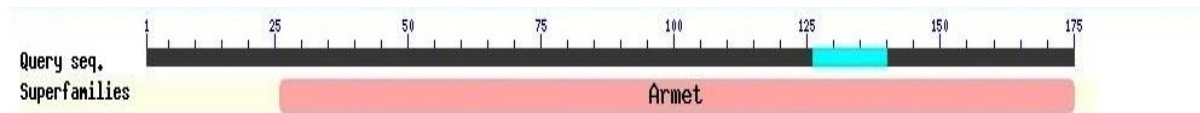


Figura 7 - Organização da proteína correspondente ao GB10060 (MANF).
 Fonte: MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011; FINN et al. 2014.

A proteína minibrain (mnb) é integrante de uma família de proteíno-quinases, subfamília fosfotransferase (HANKS; QUINN; HUTTER., 1988). Essa proteína apresenta sequências similares com as proteínas quinases dependentes de ciclina, as quais são conhecidas por controlar a proliferação celular (SHERR, 1993).

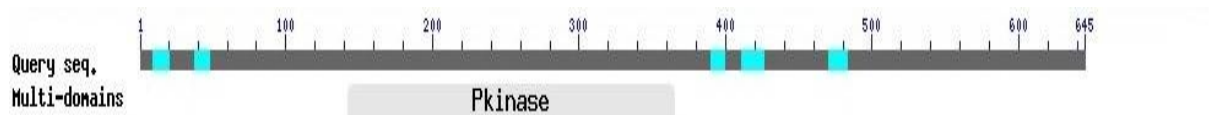


Figura 8 - Organização da proteína correspondente ao GB20129 (mnb).
 Fonte: MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011; FINN et al. 2014.

A proteína Tumbleweed é da família das RhoGTPases, pertencente a superfamília Ras (ROJAS, 2012). As RhoGTPases agem como interruptores moleculares intracelulares na regulação da dinâmica do citoesqueleto (HALL, 2012).

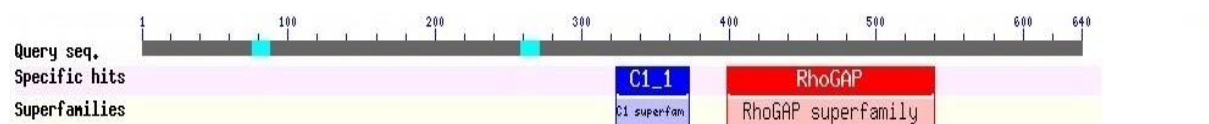


Figura 9 - Organização da proteína correspondente ao GB19273 (Tumbleweed).
 Fonte: MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011; FINN et al. 2014.

A ATP sintase- β é uma proteína componente da ATP sintase, molécula que possui dois domínios funcionais: o complexo catalítico F1 e o complexo Fo responsável pelo transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna. Há três subunidades beta no complexo F1 e cada subunidade possui um sítio de ligação catalítico para ATP, sendo um

local crítico para a síntese de ATP por meio do gradiente eletroquímico de prótons (SENIOR, et al. 1988; KOHNKE et al. 2007).

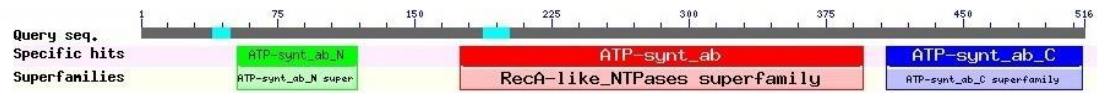


Figura 10 - Organização da proteína correspondente ao GB18839 (ATP sintase-β).

Fonte: MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011; FINN et al. 2014.

A peptidase do peptídeo sinal (SPP, GB19273, LOC409870) é da família Peptidase_A22B, sabe-se que ela promove a liberação do sinal funcional da fragmentação dos peptídeos da membrana do retículo endoplasmático (MARTOGLIO; DOBBERSTEIN, 1998). A SPP possui motivos conservados nas regiões ativadoras YD e GXGD em domínios transmembrana adjacentes, contendo também sequências conservadas em espécies distintas de vertebrados (WEIHOFEN et al. 2002).

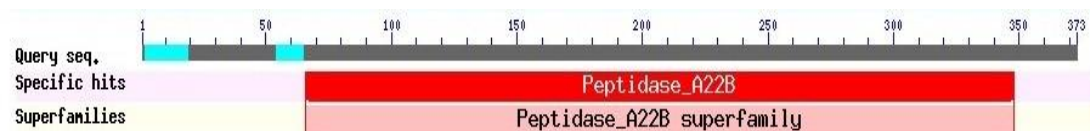


Figura 11 - Organização da proteína correspondente ao GB19273 (peptidase do peptídeo sinal).

Fonte: MARCHLER-BAUER et al. 2009, 2011; FINN et al. 2014.

Além dos cinco genes encontrados como diferencialmente expressos entre rainhas e operárias e que possuem ortólogos conhecidos em *Drosophila* apresentados acima, vários outros possuem características biológicas que justificam aprofundamentos experimentais (ver Tabelas 1 e 2 dos Anexos). Entre eles, *miniature* (GB16488), o codificador do fator de transcrição Mblk-1 (GB17328) e *sinaptotagmina 1* (GB20036). O estudo destes genes, os listados acima e genes adicionais, será abordado no futuro próximo (*minibrain* e *tumbleweed* já estão sendo estudados por membros do grupo).

4.2 PERFIL TRANSCRICIONAL DAS VARIANTES A E B DO RECEPTOR DE ECDISTERÓIDES DURANTE O DESENVOLVIMENTO PUPAL DE RAINHAS E OPERÁRIAS DE *A. MELLIFERA*

Com o objetivo de avaliar a participação dos ecdisteróides no desenvolvimento diferencial do cérebro entre pupas de rainhas e operárias, inicialmente, estimamos os níveis de expressão de *EcR* (receptor de ecdisteróides). O gene *EcR* em *A. mellifera* possui duas variantes transcricionais: a variante A (NM_001098215, XM_394760), de 2.635 nucleotídeos, e a variante B (NM_001159355), com 2.782 nucleotídeos (TAKEUCHI et al. 2007 e WATANABE; TAKEUCHI; KUBO, 2010). Desde que, usualmente, a atividade transcricional de um gene codificador de proteínas receptoras de hormônio encontra-se associada de maneira complexa aos títulos do respectivo hormônio (FAHRBACH et al. 2012; HILL et al. 2013), esperávamos encontrar perfis de transcrição específicos para cada casta. Nossos resultados mostram que ambas variantes são expressas no cérebro de abelhas durante os três estágios pupais (Pw, Pdp e Pbm) analisados, com exceção, quiçá, da variante B em rainhas (Figura 13). De maneira interessante, a variante A possui perfis opostos em rainhas e operárias. No início do desenvolvimento pupal (Pw), seus níveis são maiores em operárias do que em rainhas. No estágio Pdp há um decréscimo de transcrição em ambas as castas, sendo que em operárias a expressão continua maior do que em rainhas. No estágio Pbm a transcrição de operárias decresce ainda mais em comparação com os outros dois estágios e a de rainhas sobe, aparentando uma maior transcrição em rainhas do que operárias.

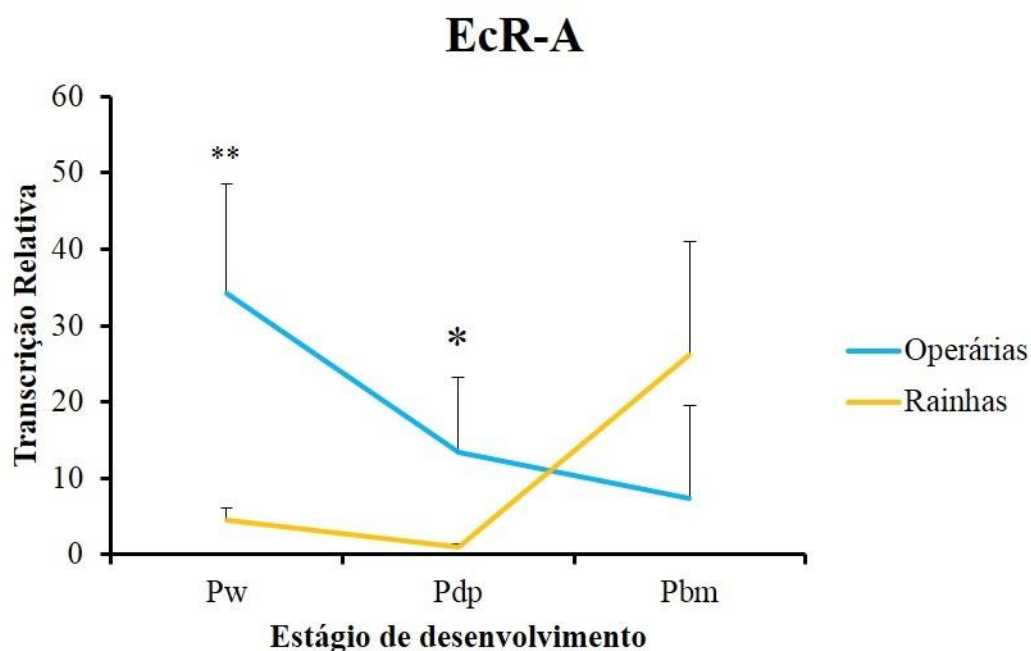


Figura 12 - Níveis relativos de expressão de EcR-A obtidos mediante PCR Tempo Real em diferentes estágios pupais em castas de *A. mellifera*.

Nota: O eixo X representa os estágios pupais (Tabela 1 e 2) analisados. O eixo Y representa a quantidade de expressão relativa de EcR-A (médias e erros de $2^{-\Delta\Delta Ct}$). O teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por * e quando $p < 0,01$ é simbolizado por **.

Fonte; Do autor

A variante B de EcR em operárias mostra um perfil de transcrição diferente do perfil de EcR-A. Seus níveis são baixos nos três estágios pupais (Pw, Pdp e Pbm) analisados (Figura 12). Já o perfil de EcR-B em rainhas é bastante similar ao perfil de EcR-A nesta casta (baixo em Pw e Pdp, e alto em Pbm). No estágio Pw, a transcrição foi relativamente maior em rainhas do que em operárias, mesmo estando próxima da linha basal. Em Pdp não houve diferença estatística na transcrição de ambas as castas, sendo que aparentemente ambas ficaram muito próximas nos níveis de expressão. No estágio Pbm é observado um significativo aumento na expressão de EcR-B no cérebro das rainhas (em operárias aparentemente o valor de expressão é semelhante ao do estágio Pw).

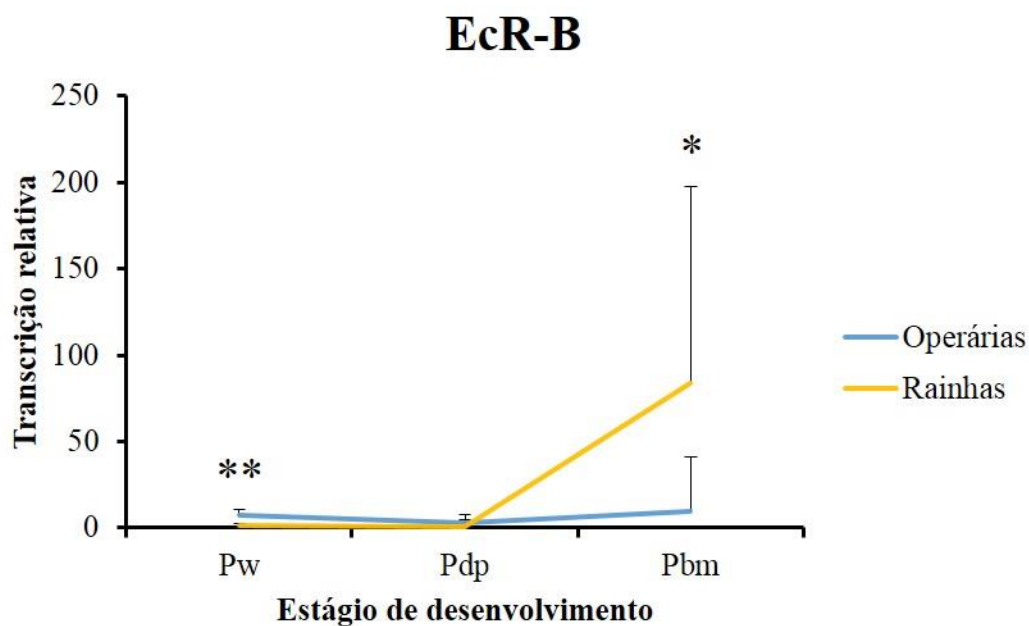


Figura 13 - Níveis relativos de expressão de EcR-B obtidos mediante PCR Tempo Real em diferentes estágios pupais em castas de *A. mellifera*.

Nota: O eixo X representa os estágios pupais (Tabela 1 e 2) analisados. O eixo Y representa a quantidade de expressão relativa de EcR-A (médias e erros de $2^{-\Delta\Delta Ct}$). O teste estatístico utilizado foi o Mann-Whitney, onde $p < 0,05$ está representado no gráfico por * e quando $p < 0,01$ é simbolizado por **.

Fonte: Do autor

5 DISCUSSÃO

Nessa sessão são discutidos os resultados da análise da expressão dos genes diferencialmente expressos em pupas Pp de *A. mellifera* mediante microarranjos de oligonucleotídeos. Também é discutido a ação do receptor de ecdisteróides influenciado por títulos hormonais na morfologia diferencial do cérebro de *A. mellifera*.

5.1 SOBRE GENES MAIS EXPRESSOS NO CÉREBRO DE OPERÁRIAS PP

O *screening* molecular em escala genômica mediante hibridação de lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos com amostras de RNA obtidas de cérebros de rainhas e operárias no estágio de desenvolvimento pupal Pp resultou em 324 sequências diferencialmente expressas, 167 com ortólogos em *Drosophila melanogaster*, todas mais expressas em operárias. Nosso grupo está debruçado na validação dos genes correspondentes a estas sequencias. Neste trabalho, selecionamos 5 deles para a realização de análises *in silico*, considerando basicamente seus níveis de transcrição relativa (Fold-Change>1,50) e o conhecimento que já se possui sobre eles: os genes da ATP sintase β , da peptidase do peptídeo sinal, da proteína *minibrain*, do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF), e da proteína *tumbleweed*.

Os genes codificadores de MANF são conservados evolutivamente. O verme *Caenorhabditis elegans* e a mosca *Drosophila melanogaster* possuem o homólogo para MANF, e uma característica estrutural são os oito resíduos de cisteína espaçados uniformemente na respectiva proteína tanto de organismos invertebrados como de vertebrados (SHRIDHAR et al. 1996; PETROVA et al. 2003; LINDHOLM et al. 2007; PALGI et al. 2009). Em termos percentuais, os aminoácidos das proteínas MANF de humanos apresentam 53 % de identidade com *D. melanogaster*, 50 % com *C. elegans* (LINDHOLM, SAARMA, 2010). O MANF possui um papel relevante no sistema nervoso central dos invertebrados. Estudos em *D. melanogaster* mostraram que DmMANF, é expresso em células gliais e possui importância na manutenção dos níveis de dopamina e de neurônios dopaminérgicos, e além disso, regula a morte celular programada (PALGI et al. 2009). Os mesmos autores mostraram, ainda, que o DmMANF é exigido no final da embriogênese de *D. melanogaster* para a maturação do

sistema nervoso, e, que, a diminuição de sua expressão conduz à morte precoce na fase larval, e os embriões mutantes sofrem degeneração axonal, desarranjos cuticulares e morte celular não-apoptótica. Em vertebrados, MANF atua na proteção de neurônios e na reparação de sintomas da Doença de Parkinson. Esta proteína em humanos possui o domínio C-terminal homólogo ao domínio de SAP KU70, que é um inibidor da proteína apoptótica Bax (HELLMAN et al. 2011). Em um experimento recente, Shen e colaboradores (2014) observaram a atuação de MANF no resgate de neurônios após ratos sofrerem isquemia cerebral. A proteína atuava inibindo a clivagem da caspase-3, que era ativa depois da oclusão da artéria média cerebral. Desse modo, a MANF inibia a via apoptótica logo após a isquemia, preservando neurônios em ratos, principalmente no córtex e no hipocampo (SAARMA et al. 2008; SHEN et al. 2014).

Desde que este gene é mais expresso em Pp de operárias, cujos cérebros sofrem menores taxas de morte celular, e que sua proteína atua como inibidora da cascata de interações proteicas que levam à morte celular em outros sistemas biológicos, MANF em abelhas é um forte candidato a desempenhar um papel fundamental na mediação dos eventos anti-apoptóticos em células dos cérebros de indivíduos desta casta.

A proteína minibrain está envolvida na neurogênese pós-embriônica em *D. melanogaster*, atuando na regulação da divisão celular (TEJEDOR et al. 1995). Uma mutação no gene *mnb* é responsável por anormalidades na distribuição de neuroblastos no cérebro larval, acarretando uma diminuição do tamanho dos lóbulos ópticos e do hemisfério central do cérebro (FISHBACH; HEISENBERG, 1984; TEJEDOR et al. 1995).

Há 4 isoformas de minibrain em *D. melanogaster* (*mnb*¹, *mnb*², *mnb*³ e *mnb*⁴) que codificam 3 proteínas distintas (A, B e C) por meio de *splicing* alternativo. As moscas-de-fruta adultas com a isoforma *mnb*¹ e *mnb*⁴ mutantes apresentam o cérebro central com tamanho reduzido em comparação com o fenótipo selvagem, enquanto que, na fase branca do estágio pupal, a *mnb*³ pode ser a responsável por uma pequena redução no tamanho dos hemisférios cerebrais por motivo de um déficit de proliferação celular (TEJEDOR et al., 1995).

O gene minibrain de *D. melanogaster* é homólogo ao DirklA em camundongos e ao Mnb/DirklA em humanos (WEGIEL et al. 2004). Em camundongos, a baixa expressão de DirklA está relacionada com o desenvolvimento anormal do cérebro devido à diminuição e do retardo da neurogênese (FOTAKI et al. 2002). A alta expressão de Mnb/DirklA é relacionada com a síndrome de Down, pois, o gene que a codifica está localizado em uma

região crítica do cromossomo 21, além disso, há um estudo que mostra que esse gene pode estar ligado à microcefalia humana (MOLLER et al. 2008; GUIMÉRÁ et al. 1996).

A neurogênese e a proliferação neural em *A.mellifera* iniciam-se na fase larval, sendo que não há formação de novos neurônios em indivíduos adultos (MALUN et al. 1998; FARRIS, 1999; FAHRBACH et al. 2006). Deste modo, a proteína minibrain é uma potencial candidata a participar dos mecanismos de inversão do volume cérebro/volume corporal entre rainhas e operárias de abelhas *A.mellifera*.

Tumbleweed inicialmente foi identificada em *D. melanogaster*, estando associada com o crescimento e a ramificação anormal dos dendritos dos neurônios sensoriais (GAO et al. 1999). Estudos posteriores demonstraram que a Tumbleweed, também chamada de RacGAP50C, está associada com a proteína Pavarotti e atua na modulação da proliferação de neuroblastos em corpos cogumelares de *Drosophila*, mais especificamente na citocinese (GOLDSTEIN, JAN, LUO, 2005). Tumbleweed atua posicionando corretamente o anel contrátil, evitando a formação de células binucleares ou multinucleares e também na orientação correta e uniformidade na polarização dos microtúbulos (MINOSHIMA et al. 2003; MISHIMA; KAITINA; GLOTZER, 2002; SOMMERS; SAINT, 2003; GUERIN; KRAMER, 2009). Experimentos de *knockdown* por meio de RNA de interferência, do gene que codifica a RacGAP50C nos neurônios dos corpos cogumelares de *D. melanogaster*, resultaram em déficit na proliferação de neuroblastos e na desorientação da extensão dos axônios, causando a redução do número final de neurônios e alterando a localização celular (GOLDSTEIN; JAN; LUO, 2005).

Assim, tumbleweed em *A.mellifera* pode estar envolvida na regulação da proliferação dos neuroblastos e assim, participando diretamente na promoção do maior desenvolvimento cerebral observado durante o período pupal de operárias, principalmente nos corpos cogumelares, que representam o centro de integração da memória e aprendizado do inseto (HEISENBERG, 2003).

A proteína ATP sintase β é uma proteína presente nas eubactérias, em cloroplastos e na membrana interna das mitocôndrias atuando na produção de ATP (WALKER et al., 1982.; PEÑA et al. 1995). Esta proteína apresenta uma taxa de 70 % na conservação dos aminoácidos em mitocôndrias de *Escherichia coli* e bovinos (KALKER et al. 1982). Em *D. melanogaster* adultas, o codificador da proteína ATP sintase beta foi clonado por PEÑA & GERESSE (1993), sendo demonstrado que há uma alta homologia entre aminoácidos de outros organismos que possuem a subunidade beta equivalente. Um estudo proteômico para a identificação de mediadores moleculares da diferenciação de castas durante o período larval

também mostrou a maior expressão de ATP sintase beta em operárias (LI et al., 2010). Em nosso trabalho, ela foi encontrada super-representada tanto nos experimentos nos que foram usados 6 µg quanto nos que foram usados 20 µg de aRNA nas hibridações [Anexo 2 (Tabelas 1 A e 1 B)], confirmando sua maior expressão em operárias. Provavelmente, sua maior expressão nos membros desta casta esteja vinculada à grande necessidade energética proveniente da típica maior proliferação celular no cérebro durante o período pupal destes insetos.

A peptidase do peptídeo sinal (SPP) é uma proteína que cliva regiões específicas de outras proteínas, participando principalmente da catálise de peptídeos sinais remanescentes da proteólise pela peptidase sinal no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (WEIHOFEN et al. 2002). Além disso, o SPP realiza o deslocamento e o controle de qualidade de proteínas do retículo endoplasmático em eucariotos superiores (LOUREIRO et al. 2006; CRAWSHAW et al. 2004). Nos humanos, a SPP é exigida para gerar o epítipo do antígeno leucocitário humano (HLA-E), que possui um papel importante no sistema imune (BRAUD et al. 1998; LEMBERG et al. 2001). Uma regulação negativa do gene *SPP* em *zebrafish* pode acarretar a morte embrionária e em organismos adultos foram notadas perturbações no sistema nervoso central (KRAWITZ et al. 2005). Em *D. melanogaster* com deficiência ou ausência de expressão da proteína SSP é observada a má-formação das traquéias, da glândula salivar e a morte celular generalizada em período larval (CASSO et al. 2005). Mais expressa em cérebros de operárias, pode participar em processos que reprimem os eventos de morte celular típicos em cérebros de rainhas, e, assim, ser uma das proteínas responsáveis pela morfogênese cerebral diferencial entre castas.

Trabalhos prévios de nosso grupo mostraram que perfis de transcrição de outros genes neurogênicos como *atx-2* (ataxin-2, que em *Drosophila* regula o caminho de formação dos filamentos de actina por mecanismos indiretos, SATTERFIELD; JACKSON; PALLANCK, 2002) e *fax* (failed axon connection, que em *Drosophila* participa na formação das conexões de axônios, (ANHOLT et al. 2003; HILL et al. 1995) também são maiores em operárias no mesmo período temporal estudado por nós (GIANELLI, 2011). Resumindo, as proteínas minibrain, tumbleweed, ATP sintase, *atx-2* e *fax*, associadas a eventos proliferativos, e as proteínas MANF e SPP, associadas a processos de inibição da morte celular, todas mais expressas em cérebro de pupas (Pp) de operárias em resposta ao ambiente hormonal casta-específico mediado pelo receptor de ecdisteróides, poderiam constituir o cerne da maquinaria responsável pela morfogênese diferencial do cérebro entre castas de *A. mellifera* (ver Figura 14).

5.2 O RECEPTOR DE ECDISTERÓIDES E A MORFOGÊNESE DIFERENCIAL DO CÉREBRO EM PUPAS DE CASTAS DE *A. MELLIFERA*

O gene *EcR* codifica para o receptor de ecdisona, o qual é parte da superfamília de receptores nucleares (NR), que, acoplado à proteína Ultraspiracle (USP), forma o receptor ativo que media a ação dos hormônios ecdisteróides (TAKEUCHI et al., 2007, WATANABE; TAKEUCHI; KUBO, 2010, FAHRBACH; SMAGGHE; VELARDE, 2012, HILL et al. 2013;). Em *D. melanogaster*, esta ação consiste usualmente na promoção de uma cascata de transcrição de genes de resposta primária (precoces) (HENRICH, 2012; THUMMEL, 1995; PETRIK et al. 2003). Os genes de resposta primária, entre eles os codificadores dos fatores de transcrição BR-C, E74 e E75, aumentam o sinal hormonal original (RIDDIFORD; CHERBAS; TRUMAN, 2000) e podem realizar um feedback negativo de sua expressão e também regular positivamente a expressão dos genes de resposta secundária (LEE et al. 2000; YIN, THUMMEL, 2005). Em *A. mellifera*, estes hormônios (fundamentalmente a makisterona A) parecem participar na mediação da morte celular diferencial em cérebros pupais (ROAT, LANDIM, 2008), promovendo, assim, um proporcionalmente maior desenvolvimento cerebral em operárias (GANESHINA; SCHÄFER; MALUN, 2000; MALUN; MOSELEIT; GRÜNEWALD, 2003). Faziam isto após formar um complexo com seu receptor (EcR/USP) e desencadear cascatas de expressão gênica específicas, que incluíam a expressão diferencial do grupo de genes identificados por *microarrays*.

Os resultados da determinação de perfis de *EcR* em cérebro de rainhas mostram, primeiramente, que em presença de altos títulos de ecdisteróides (durante os estágios Pw e Pdp; ver PINTO et al. 2002), a expressão de ambas variantes de EcR (A e B) é basal e aumenta quando os títulos dos hormônios diminuem, em Pbm. Isto sugere que a expressão de *EcR* em rainhas é reprimida por altos títulos de ecdisteróides. Em operárias, por outro lado, encontramos uma situação bem diferente. Os níveis de transcrição de EcR-A são altos em Pw, quando os títulos de ecdisteróides são ainda baixos, e diminuem em Pdp e Pbm, juntamente com os títulos hormonais. Isto sugere que *EcR* em operárias possui uma sensibilidade diferente aos hormônios do que o EcR em rainhas, muito provavelmente devido a que o ambiente hormonal de ambas castas neste período não é exatamente o mesmo. Uma resposta semelhante de *EcR* à ação de ecdisteróides foi mostrada por Mello et al., também em *A. mellifera* (em prep.). Tanto as análises de perfis de expressão quanto de aplicação de ecdisona

exógena sugeriram que, de maneira geral, altos títulos de ecdisteróides reprimem a expressão de *EcR* em pupas (animal inteiro). Resultados similares foram encontrados em outros insetos. Em *Manduca sexta*, mostrou-se que altos títulos de 20E reprimem e baixos títulos promovem a expressão de *EcR* (JINDRA et al. 1996). Mais ainda, em organismos com mais de uma variante de *EcR*, é comum que cada uma delas possua perfis de expressão e funções diferentes (TAN; PALLI, 2008; WENG et al. 2013). Em *D. melanogaster* o gene *EcR* dá origem a três variantes conhecidas, *EcR A*, *B1* e *B2* (TALBOT; SWYRYD; HOGNESS, 1993). A variante *A* é relativamente mais expressa em um grupo de neurônios oriundos da fase embrionária destinados a passar pelo processo de apoptose na muda pupa-adulto e uma condição para que isso ocorra é que os títulos de ecdisteróides estejam baixos. A variante *B1* pode induzir a sobrevivência celular inibindo processos apoptóticos mediante a repressão das caspases (ROMANI et al. 2009). A variante *B2* atua como mediador da transdução de sinal da apoptose efetuada por *rpr* em um grupo de neurônios do cordão nervoso ventral na fase larval (CHOI; LEE; PARK, 2006). E no inseto *Bombyx mori*, a variante *B1* está associada a morte celular das células da glândula labial (GONCU; PARLAK, 2008).

Os perfis de transcrição obtidos em nosso trabalho sugerem também que em rainhas ambas variantes são ativas durante o desenvolvimento pupal. Já em operárias, a única variante expressa em quantidades comparativamente importantes parece ser a variante *A*.

O ambiente criado pelos títulos de ecdisteróides e os níveis de seus receptores (supondo que os respectivos mRNAs sejam traduzidos logo após sua síntese) em pupas de rainhas e operárias podem contribuir para explicar a morfogênese diferencial do cérebro se considerarmos os resultados publicados por GANESHINA; SCHÄFER; MALUN (2000) e MALUN; MOSELEIT; GRÜNEWALD (2003). Estes autores, a partir de experimentos de aplicação hormonal, mostraram que a proliferação de neuroblastos em corpos cogumelares de operárias é inibida por 20E (ver Figura 14). Os ecdisteróides poderiam ser os responsáveis pela diferença nas taxas de proliferação/morte celular em favor de operárias, se seus altos títulos em Pw-Pdp de rainhas promovessem a inibição da proliferação em razão de baixas quantidades (ou ausência) do receptor de ecdisteróides (não formação do complexo hormônio-receptor), mediante algum mecanismo que prescindia do receptor (DAVIS; LI, 2013). Em operárias, os equivalentes altos títulos de ecdisteróides encontrariam, por sua vez, altos níveis do receptor, o que levaria à formação do complexo hormônio-receptor, que por sua vez resultaria na manutenção da proliferação de neuroblastos. Evidências sobre uma ação inibitória (mesmo que transitória) dos ecdisteróides sobre a morte celular no sistema nervoso foram encontradas em trabalhos de ROBINOW et al. (1993; ver também SCHUWARTSZ;

TRUMAN, 1983). Esta interpretação cobra mais sentido no marco dos resultados de MALUN; MOSELEIT; GRÜNEWALD (2003), isto é, a inibição da proliferação de neuroblastos em cérebro de operárias (usadas em seus experimentos) pelo aumento do balanço hormônio/receptor. Em resumo, a existência de um limiar de balanço hormônio/receptor por cima do qual (em excesso de hormônio) o sistema promoveria maior morte celular do que proliferação (o que acontece em rainhas) explicaria a morfogênese diferencial do cérebro em pupas de castas de abelhas.

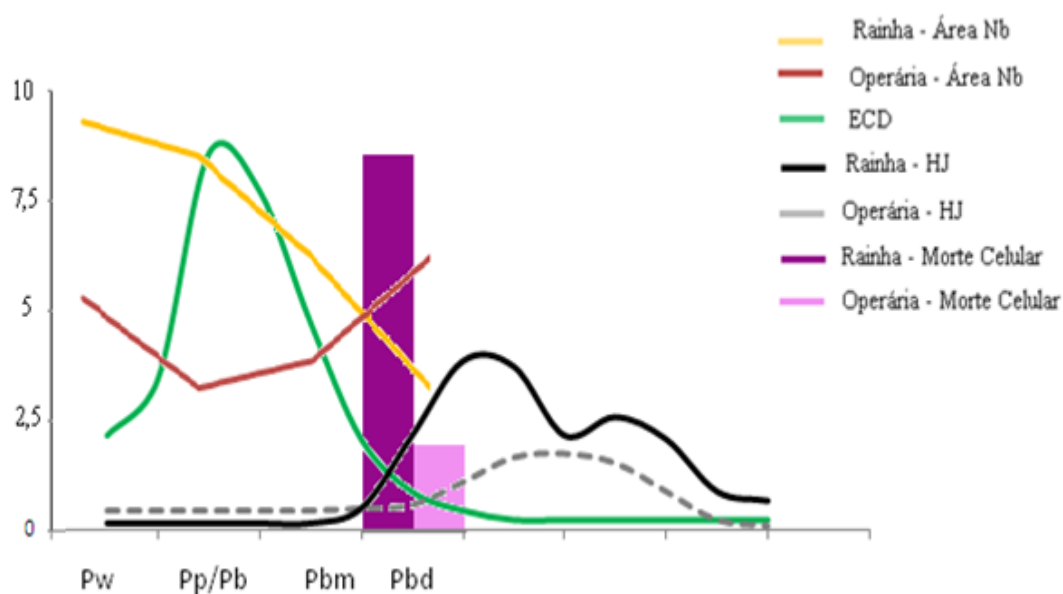


Figura 14 - Gráfico integrando dados sobre níveis de ecdisteróides (ECD), hormônio juvenil (HJ) e morte e proliferação celulares ao longo do desenvolvimento pupal.

Nota: Nb: área de neuroblastos

Fonte: Gianelli, 2011

6 CONCLUSÃO

Os produtos proteicos correspondentes aos genes *atx-2* e *fax* (Gianelli, 2011) e os encontrados pela hibridação de *microarrays* em nosso trabalho (entre eles *ATP sintase β*, *PPS*, *minibrain*, *MANF*, e *tumbleweed*), mais expressos em operárias, seriam os efetores da morfogênese diferencial do cérebro (inversão do volume do cérebro/volume corporal entre castas em pupas de *A. mellifera* em favor das operárias, em relação ao padrão larval). Estes genes efetores expressar-se-iam em maior proporção em cérebro de operárias em resposta ao ambiente hormonal e à disponibilidade do receptor de ecdisteróides (EcR-A). Assim, nossos resultados junto com nossa hipótese de trabalho apontam para a necessidade de experimentos que permitam a validação dos níveis de expressão dos genes encontrados diferencialmente expressos mediante *microarrays* de oligonucleotídeos e a consequente validação funcional de genes que se apresentem como chaves no processo de morfogênese diferencial do cérebro entre castas.

REFERÊNCIAS

AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF Family: Signaling biological functions and therapeutic value. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 383-394, 2008.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Reviews**, v. 25, n. 8, p. 868-878, 1997.

ANHOLT, R. R. et al. The genetic architecture of odor-guided behavior in *Drosophila*: epistasis and the transcriptome. **Nature Genetics**, v. 35, p. 180-184, 2003.

ASENCOT, M.; LENSKY, Y. The effect of sugars and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera L.*) to queens. **Life Sciences**, v. 18, p. 693-700, 1976.

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

ASHBURNER, M. et al. Puffs, genes, and hormones revisited. **Cell**, v. 61, p. 1-3, 1990

BARCHUK, A. R.; BITONDI, M. M. G.; SIMÕES Z. L. Effects of juvenile hormone and ecdysone on the of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. **Journal of Insect Science**, v. 2, p. 1-7, 2002.

BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 70, p. 1-19, 2007.

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

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

BOMTORIN, A. D. et al. Hox gene expression leads to differential hind leg development between honeybee castes. **PLoS ONE**, v. 7, p. e40111, 2012.

BONATTI, V. **Organização e perfil de expressão de genes associados à neurogênese em castas de abelhas *Apis mellifera***. 2009. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2009.

BRANDT, R. et al. Tree-dimensional average-shape atlas of the honey bee brain and its applications. **Journal Comparative Neurology**, v. 492, p. 1-19, 2005.

BRAUD, V. et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. **Nature**, v. 391, p. 795-799, 1998.

CAMERON, R. C.; DUNCAN, E. J.; DEARDEN, P. T. Biased gene expression. In early honeybee larval development. **BMC Genomics**, v. 14, p. 903, 2013.

CAPALDI, E. A.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Neuroethology of Spatial Learning: The Birds and the Bees. **Annual Review of Psychology**, v. 50, p. 651-682, 1999.

CASSO, D. J. et al. Drosophila signal peptide peptidase is na essencial protease for larval development. **Genetics Society of America**, v. 170, p. 139-148, 2005.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. New York, Cambridge University Press, 1998, 770p.

CHOI, Y-J.; LEE, G.; PARK, J. H. Programmed cell death mechanisms of identifiable peptidergic neurons in *Drosophila melanogaster*. **Development**, v. 133, p. 2223-2232, 2006.

CRAWSHAW, S. G. et al. A misassembled transmembrane domais of a polytopic protein associates with signal peptide peptidase. **Biochemical Journal**, v. 384, p. 9-17, 2004.

CRUZ-LANDIM, C.; ZANIBONI, M. C.. Estudo do tamanho relativo de algumas estruturas cerebrais de abelhas (Hymenoptera, Apidae). **Naturalia**, v. 11/12, p. 23-32, 1986/1987.

DAVIS, R. L.; MCGUIRE, S. E.; PHUONG, T. L. The Role of Drosophila Mushroom Body Signaling in Olfactory Memory. **Science**, v. 293. n. 5533, p. 1330 – 1333, 2001.

DAVIS, M. B.; LI, T. R. Genomic analysis of the ecdysone steroid signal at metamorphosis onset using ecdysoneless and EcRnull *Drosophila melanogaster* mutants. **Genes & Genomics**, v. 35, p. 21-46, 2013.

FAHRBACH, S. E.; SMAGGHE, G.; VELARDE, R. A. Insect Nuclear Receptors. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 83-106, 2012.

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

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 209-232, 2006.

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

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 structure development**, v. 32, p. 79-101, 2003.

FINN, R. D. et al. Pfam: the protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 222-230, 2014.

FISHBACH, K. F.; HEISENBERG, M. Neurogenetics and behavior in insects. **The Journal of Experimental Biology**, v. 112, p. 65-93, 1984

FLÖGEL, J. H. L. Über den feineren Bau des Arthropodengehirns. **Tagbl. Versamml. dtshr. Naturforsch. Ärzte. (Beilage)**, v. 49, p. 115-120, 1876.

FOTAKI, V. et al. Dyrk1A Haploinsufficiency Affects Viability and Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 18, p. 6636-6647, 2002.

FREIRE, A. C. G. **O código transcricional gerado pelo cérebro sob influência de diferenciais dietários durante o desenvolvimento do sistema nervoso de *Apis mellifera***. 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

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

GAO, F. B. et al. Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. **Genes & Development**, v. 13, p. 2549-2561, 1999.

GERBER, B., Visual learning in individually assayed *Drosophila* larvae, **Journal of Experimental Biology**, v. 207 p. 179-188, 2004.

GIANELLI, H. H. S. **Expressão gênica e morfogênese diferencial do cérebro de fêmeas de *Apis mellifera* durante o desenvolvimento pupal**. 2011. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

GILBERT, L. I. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 215, p. 1-10, 2004.

GOLDSTEIN, A. Y. N., JAN, Y. N.; LUO, L. Function and regulation of tumbleweed (RacGAP50C) in neuroblast proliferation and neuronal morphogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 10, p. 3834-3839, 2005.

GONCU, E.; PARLAK, O. Morphological changes and patterns of scdysone receptor B1 immunolocalization in the anterior silk gland undergoing programmed cell death in the silkworm *Bombyx mori*. **Acta Histochemica**, v. 111, p. 25-34, 2008.

GUERIN, C. M., KRAMER, S. G. RacGAP50C directs perinuclear γ -tubulin localization to organize the uniform microtubule array required for *Drosophila* myotube extension. **Development**, v. 136, p. 1411-1421, 2009.

GUIMERÁ, J. et al. A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. **Human Molecular Genetics**, v. 5, p. 1305-1310, 1996.

GUO, X. et al. Recipe for a busy bee: miRNAs in honey bee caste determination. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81661, 2013.

HALL, A. Rho family GTPases. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 1378-1382, 2012.

HANKS, S. K.; QUINN, A. M.; HUTTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**, v. 241, p. 42-52, 1988.

HARTFELFER, K. SCHIMDT-CAPELLA, I. C. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in castespecific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 385-391, 1998.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current Topics Development Biology**, v. 40, p. 45-77, 1998.

HEISENBERG, M. Mushroom body memoir: from maps to models. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, p. 266-275, 2003.

HELLMAN, M. et al. Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 2675-2680, 2011.

HENRICH, V. C. **The ecdysteroid receptor. Insect Endocrinology**. 1. ed. Academy Press, San Diego, p. 177-218, 2012.

HILL, R. J.; BILLAS, I. M. L.; BONNETON, F.; GRAHAM, L. D.; LAWRENCE, M. C. Ecdysone Receptors: From the Ashburner model to structural biology. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 251-271, 2013.

HILL, K. K. et al. Genetic interactions between the Drosophila Abelson (Abl) tyrosine kinase and failed axon connections (fax), a novel protein inaxon bundles. **Genetics**, v. 141, p. 595-606, 1995.

HORRIDGE, A. Generalization in visual recognition by the honeybee (*Apis mellifera*): a review and explanation. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 499-511, 2009

HONEY BEE GENOME CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, p. 931-949, 2006.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 677-736, 2001.

JINDRA, M. et al. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Developmental Biology**, v. 180, p. 258-272, 1996.

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

KENYON, F. C. The brain of the bee, A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the arthropoda, **Journal Comparative Neurology**, v. 6, p. 133-210, 1896.

KIM, K. et al. Glutathione S-transferase omega 1 activity is sufficient to suppress neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 6628-6641, 2012.

KIM, K.; LIM, J. Glutathione S-transferase omega suppresses the defective phenotypes caused by PINK1 loss-of-function in *Drosophila*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, p. 615-619, 2013.

KOHNKE, R., et al. Fatty acids and glucose in high concentration down-regulates ATP synthase-beta subunit protein expression in INS-1 cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 10, p. 273-278, 2007.

KRAWITZ, P. et al. differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 47, p. 39515-39523, 2005.

LEE, C. Y. et al. E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. **Molecular Cell**, v. 6, p. 433-443, 2000.

LEIMAR, O. et al. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees – a modeling approach. **Ecology and Evolution**, v. 2, p. 3098-3109, 2012.

LEMBERG, M. K. et al. Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 6441-6446, 2001.

LI, J. et al. Differential protein expression in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Larvae: Underlying Caste differentiation. **PLoS ONE**, v. 5, p. e13455, 2010.

LINDHOLM, P. et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. **Nature**, v. 448, p. 73-77, 2007.

LINDHOLM, P.; SAARMA, M. Novel CDNF/MANF Family of Neurotrophic Factors. **Development Neurobiology**, v. 70, p. 360-371, 2010.

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

LOUREIRO, J. et al. Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum. **Nature**, v. 441, p. 894-897, 2006.

LUCHT- BERTRAM, E. Das postembryonale wachstum von hirnteilen bei *Apis mellifera* L. und *Myrmica europaea*. **L.Z. Morph Ökol Tiere**, v. 50, p. 543-575, 1962.

MAESTRO, J. L.; COBO, J.; BELLÉS, X. Target of rapamycin (TOR) mediates the transduction of nutritional signals into juvenile hormone production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5506-5513, 2009.

MALUN, D. Early development of mushroom bodies in the brain of the honeybee *Apis mellifera* as revealed by BrdU incorporation and ablation experiments. **Learning and Memory**, 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*. **Journal of Neurobiology**, v. 57, p. 1-14, 2003.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 225-229, 2011.

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

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

MARTOGLIO, B.; DOBBERSTEIN, B. Signal sequences: more than just greasy peptides. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 410-415, 1998.

MEDVED, V.; HUANG, Z. Y.; POPADIC, A. Ubx promotes corbicular development in *Apis mellifera*. **Biology Letters**, v. 10, n. 1, p. 20131021, 2014.

MELLO et al., Development regulation of ecdysone receptor (EcR) gene expression and of its targets in the honeybee, *Apis mellifera*. (em preparação).

MENZEL, R. Learning in honey bees in a ecological and behavioral context. In: **Experimental behavioral ecology and sociobiology**. Ed. B Hölldobler, M Lindauer Fischer, Stuttgart, 1985, p. 55-74.

MENZEL, R.; GREGGERS, U.; HAMMER, M. Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. In: Papaj DR, Lewis AC (eds) **Insect learning: ecological and evolutionary perspectives**. Chapman and Hall, New York, pp. 79-12, 1993.

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.

MINOSHIMA, Y. et al. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. **Development Cell**, v. 4, p. 549-560, 2002.

MISHIMA, M., KAITNA, S., GLOTZER, M. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. **Development Cell**, v. 2, p. 41-54, 2002.

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

MODA, L. M. R. et al. A nutritionally-driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. **PlosONE**, v. 8, p. e64815, 2013.

MOBBS, P. G. The brain of the honeybee, *Apis mellifera*. I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. **Philosophical Transactions of the Royal Society (London) B**. v. 298, p. 309-354. 1982.

MOLLER, R. S. et al. Truncation of the Down Syndrome Candidate Gene DYRK1A in Two Unrelated Patients with Microcephaly. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, p. 1165-1170, 2008.

NELSON, J. A., **The Embryology of the honey bee**. Princeton Univ. Press, 1915.

NIVEN, J. E.; GRAHAM, C. M.; BURROWS, M. Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 253-271, 2008.

NORDLAND, R. H.; EDWARDS, J. S. Postembryonic brain development in the monarch butterfly *Danaus plexippus plexippus* L.I. Cellular events during brain morphogenesis. **Wilhelm Roux's Archives**, v. 162, p. 197-221, 1969.

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

PALGI, M. et al. Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 2429-2434, 2009.

PANOV, A. A. Bau des Insektengehirns während der postembryonalen Entwicklung. **Review Entomology URSS**, v. 39, p. 269–284, 1957.

PEÑA, P. et al. Analysis of the mitochondrial ATP synthase β -subunit gene in Drosophilidae: structure, transcriptional regulatory features and developmental pattern of expression in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Journal**, v. 312, p. 887-897, 1995.

PEÑA, P.; GARESSE, R. The β subunit of the *Drosophila melanogaster* ATP Synthase: cDNA, aminoacids analysis and identification of the protein in adult flies. **Biochemical and Biophysical Research Communicatins**, v. 195, p. 785-791, 1993.

PETRIK, A et al . Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 13773-13778, 2003.

PETROVA, P et al. MANF: A new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic fator with selectivity for dopaminergic neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 20, p.173-188, 2003.

PFAFFL, M. W. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnological Letters**, v. 26, p. 509-515, 2004.

PINTO, L. Z. et al. Ecdysteroids titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 783-790, 2002.

REMBOLD, H.; LACKNER, B.; GEISTEBECK, I. The chemical basis of honey bee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen determinator from royal jelly. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, p. 307-314, 1974.

REMBOLD, H.; KERMER, 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.

RIDDIFORD, L. M.; CHERBAS, P.; TRUMAN, J. W. Ecdysone receptors and their biological actions. **Vitamins & Hormones**, v. 60, p. 1-73, 2000.

RYBAK, J.; MENZEL, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. **Journal of Comparative Neurology**, v. 334, n. 3, p. 444-65, 1993.

ROAT, T. C. **Diferenciação do cérebro de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) durante a metamorfose: Estudo comparativo entre castas e sexos**. 2008. 245f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, C. Temporal and morphological difference in post-embryonic differentiation of the mushroom bodies in the brain of workers, queens, and drones of *Apis mellifera*. **Micron**, v. 39, p. 1171-1178, 2008.

ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in worker, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, v. 41, p. 382-389, 2010.

ROBINOW, S. et al. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. **Development**, v. 119, p. 1251-1259, 1993.

ROBINSON, G. E.; GROZINGER, C. M.; WHITFIELD, C. W. Sociogenomics: social life in molecular terms. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 257-270, 2005.

ROJAS, A. M. et al. The Ras superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. **The Journal of Cellular Biology**, v. 196, p. 189-201, 2012.

ROMANI, P. et al. Cell survival and polarity of *Drosophila* follicle cells require the activity of ecdysone receptor B1 isoform. **Genetics**, v. 181, p. 165-175, 2009.

SAARMA, M. et al. MANF is widely expressed in mammalian tissues and differentially regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 39, p. 356-371, 2008.

SATTERFIELD, T. F.; JACKSON, S. M., PALLANK, M. J. A *Drosophila* homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation. **Genetics**, v. 162, p. 1687-1702, 2002.

SCHUWARTZ, L. M.; TRUMAN, J. W. Hormonal control of rates of metamorphic development in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental Biology**, v. 99, p. 103-114, 1983.

SENIOR, A. E. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. **Physiological Reviews**, v. 68, p. 177-216, 1988.

SHEN, Y. et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor prevents neuron loss via inhibiting ischemia-induced apoptosis. **Journal of Neurological Sciences**, v. x, p. x, 2014.

SHERR, C. J. Mammalian G₁ cyclins. **Cell**, v. 73, p. 1059-1065, 1993.

SHI, Y. Y. et al. Epigenetic Modification of Gene Expression in Honey Bees by Heterospecific Gland Secretions. **PLoS ONE**, v. 7, p. e43727, 2012.

SHRIDHAR, V. et al. A gene from human chromosomal band 3p21.1 encodes a highly conserved arginine-rich protein and is mutated in renal cell carcinomas. **Oncogene**, v. 12, p. 1931-1939, 1996.

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

SMITH, C. R. Genetic and genomic analysis of the division of labour in insect societies. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 735-748, 2008.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy of the honey bee**. Whashington: Cornell University Press, 1956.

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

SOMERS, W. G., SAINT, R. A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. **Development Cell**, v. 14, p. 29-39, 2003.

SRINIVAZAN, M. V. Honeybees as a model for the study of visually guided flight, navigation, and biologically inspired robotics. **Physiological Reviews**, v. 91, p. 413-460, 2011.

STRAUSFELD, N. J. Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. **Journal of Comparative Neurology**, v. 450, p. 4-33, 2002.

STRAUSS, R. The central complex and the genetic dissection of locomotor behavior. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, p. 633-638, 2002.

SUZUKI, H. Convergence of olfactory inputs from both antennae in the brain of the honeybee. **The Journal of Experimental Biology**, v. 62, p. 11-26, 1975.

TAKEUCHI, H. et al. EcR-A expression in the brain and ovary of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Zoological Science**, v. 24, p. 596-603, 2007.

TALBOT, W. S.; SWYRYD, E. A.; HOGNESS, D. S. Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. **Cell**, v. 73, p. 1323-1337, 1993.

TAN, A.; PALLI, S. R. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 291, p. 42-49, 2008.

TEJEDOR, F. et al. Minibrain: A new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. **Neuron**, v. 14, p. 287-301, 1995.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v. 270, p. 593-598, 1995.

THUMMEL, C. S. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. **Cell**, v. 83(6), p. 871-877, 1995.

TRUMAN, J. W. Cell death in invertebrate nervous systems. **Annual Reviews in Neuroscience**, v. 7, p. 171-88, 1984.

THORN, R. S.; TRUMAN, J. W. Sex-specific neuronal respecification during the metamorphosis of the genital segments of the tobacco hornworm moth *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 284, p. 489-503, 1989.

VON FRISCH, K. Honeybees: Do they use direction and distance information provided by their dances? **Science**, n. 158, p. 1072-1075, 1967.

WALKER, J. E. et al. Distantly related sequences in the α - and β -subunit of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **The EMBO Journal**, v. 8, p. 945-951, 1982.

WARREN, J. T. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 11043-11048, 2002.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Structural diversity and evolution of the N-terminal isoform-specific region of ecdysone receptor-A and B1 isoforms in insects. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10:40, p. 1-17, 2010.

WEGIEL, J. et al. Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. **Brain research**, v. 1010, p. 69-80, 2004.

WEIHOFEN, A. et al. Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-Type Aspartic protease. **Science**, v. 296, p. 2215-2218, 2002.

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

WENG, H. et al. Cloning and characterization of two EcR isoforms from Japanese pine sawyer, *Monochamus alternates*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 84, p. 27-42, 2013.

WILSON E. O. Chemical communication in the social insects. **Science**, v. 149, p. 1064-1071, 1965.

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

WILSON, E. O.; HÖLDOBLER, B. Eusociality: Origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 13367-13371, 2005.

WINSTON, M. L. **The biology of the honeybee**. Cambridge: Harvard University Press, 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. **Journal of Neurobiology**, v. 26, p. 130-144, 1995.

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 Molecular Biology**, v. 15, p. 597-602, 2006.

WHITE, K.; KANDEL, D. R. Patters of cell division and cell movement in the formation of the imaginal nervous system in *Drosophila melanogaster*. **Developmental Neurobiology**, v. 65, p. 296-321, 1978.

YAO, T. P. et al. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. **Nature**, v. 366, p. 476-479, 1993.

YIN, V. P.; THUMMEL, C. S. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 237-243, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Script utilizado para rodar no programa R os dados gerados pela leitura em scanner.

```
#####  
# Mudar o diretório para a pasta onde foram extraídos os arquivos do Banco de Dados  
#####  
Setwd ("C: Users/Meus Documentos/Analise Microarray")  
  
Getwd()  
  
#####  
# Carregar a pacote limma  
#####  
  
library("limma")  
  
#####  
# Carregar o arquivo onde mostra como foi feito a hibridação (target)  
#####  
  
targets <- readTargets("targets_tadeu.txt")  
  
#####  
# Carregar um objeto com as intensidades de expressão dos genes  
#####  
  
RG <- read.maimages(targets$FileName, source="genepix")  
spotTypes <- readSpotTypes("spottype_BeeOligo120406_color.txt")  
  
#####  
# Acrescentar ao objeto RG o nome, tipo e a localização de cada gene  
#####  
  
RG$genes <- readGAL(galfile="BeeOligo120406_GB.txt")  
RG$printer <- getLayout(RG$genes)  
RG$genes$Status <- controlStatus(spotTypes, RG)  
  
#####  
# Plotagem de laminas do Background sem correção  
#####  
  
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {  
  slidename <- removeExt(targets$FileName[i])  
  png(paste("graf_redbackground_",slidename,".png", sep=""))  
  imageplot(log2(RG$Rb[,i]), RG$printer, low="white", high="red")  
  dev.off()}
```

```

for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
  slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
  png(paste("graf_greenbackground_",slidename,".png", sep=""))
  imageplot(log2(RG$Gb[,i]), RG$printer, low="white", high="green")
  dev.off()}

```

```

#####
# Correção do Background
#####

```

```

RGr <- backgroundCorrect(RG, method="normexp", offset=50)

```

```

for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
  slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
  png(paste("graf_RGrbackground_",slidename,".png", sep=""))
  plotMA(RGr, array=i)
  dev.off()}
png("graf_RGr_densities.png")
plotDensities(RGr)
dev.off()

```

```

#####
# Normalização dentro do arrays
#####

```

```

MA.w <- normalizeWithinArrays(RGr, method="loess")

```

```

for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
  slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
  png(paste("graf_MAw_",slidename,".png", sep=""))
  plotMA(MA.w, array=i)
  dev.off()}
  png(paste("graf_MAw_tip_",slidename,".png", sep=""))
  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()

```

```

#####
# Normalização entre os arrays
#####

```

```

MA.b <- normalizeBetweenArrays(MA.w)
for(i in c(1:length(RG$R[1,]))) {
  slidename <- removeExt(targets$FileName[i])
  png(paste("graf_MAb_",slidename,".png", sep=""))
  plotMA(MA.b, array=i)
  dev.off()
  png(paste("graf_MAb_tip_",slidename,".png", sep=""))
  plotPrintTipLoess(MA.b, array=i)
  dev.off()
  png(paste("graf_MAbbackground_",slidename,".png"))
  imageplot(MA.b$M[i], RG$printer, zlim=c(-3,3))
  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()

#####
# Estabelecer a referência
#####

biolrep <- c(1, 1, 1, 1, 2, 2, 2, 2)
corfit <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups = 1, block = biolrep)
reference <- "OpPp"
design <- modelMatrix(targets, ref=reference)
cor <- duplicateCorrelation(MA.b, ndups= 2, spacing=1)

#####
# Calcular as estatísticas de testes utilizando a abordagem bayesiana empírica
#####

fit2 <- lmFit(MA.b, design, ndups=2, correlation=cor$consensus.correlation)

fit.eb<- eBayes(fit2)
for(i in c(1:length(fit.eb$t[1,]))) {
  coef_name <- colnames(fit.eb$coefficients)[i]
  png(paste("graf_MA_fit_",coef_name,".png", sep=""))
  plotMA(fit.eb, array=i)
  abline(0,0,col="blue")
  dev.off()
  png(paste("graf_volcano_", coef_name, ".png", sep=""))
  volcanoplot(fit.eb,coef=i,names=fit.c$genes$Name,xlab="Log2(Fold-Change)",
              ylab="-log10(P-Value)", pch=16, cex=0.35, main=coef_name)
  abline(v=c(-1,1), col="blue")
  abline(h=-log(0.05,10), col="red")
  dev.off()}

```

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

```
#####  
# Plotagem do gráfico Volcano; Expressão Diferencial dos genes  
#####
```

```
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()
```

ANEXO B - Tabelas de genes diferencialmente expressos no cérebro de rainhas e operárias de *A. mellifera*. As tabelas estão divididas em 1 A e 1 B, de acordo com a quantidade de amostra que as lâminas foram hibridadas

Tabela 1 A- Genes diferencialmente expressos com uma amostra de 6 µg de amostra de RNA de cérebro. Todos os genes mais expressos são da casta de operárias.

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB13596	0,001	ATP synthase β	2,419
GB14798	0,001	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1	2,180
GB11560	0,002	Protein phosphatase 2A at 29B	2,147
GB15359	0,002	Signal peptide peptidase	2,001
GB19273	0,003	Phosphoglycerate kinase	1,964
GB11056	0,003	Stress-sensitive B	1,896
GB17499	0,004		1,849
GB20002	0,005		1,838
GB18912	0,005	26-29kD-proteinase	1,837
GB11701	0,005	Adaptor Protein complex 2, µ subunit	1,829
GB11055	0,005		1,828
GB16488	0,005	Miniature	1,821
GB16842	0,005		1,816
GB11432	0,006	BM-40-SPARC	1,812
GB17480	0,006	Vacuolar H ⁺ -ATPase SFD subunit	1,796
GB20129	0,007	Minibrain	1,759

(Continua)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB16844	0,007	Elongation factor 1 α 48D	1,740
GB19328	0,008	Msh6	1,737
GB12953	0,008	Regulatory particle non-ATPase 11	1,723
GB17681	0,008	Actin 5C	1,717
GB10832	0,008		1,715
GB18683	0,008	Annexin B9	1,715
GB11983	0,008	Angiotensin converting enzyme	1,708
GB17931	0,009		1,697
GB11572	0,009	Inos	1,696
GB17328	0,009	Ecdysone-induced protein 93F/ Mblk-1(?)	1,695
GB10060	0,010	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic fator	1,690
GB15691	0,010		1,682
GB12827	0,010	Regulatory particle non-ATPase 3	1,680
GB10118	0,010	Na ⁺ /H ⁺ hydrogen exchanger 2	1,678
GB12181	0,011		1,671
GB18498	0,011		1,670
GB15172	0,011	Lethal (1) G0255	1,666
GB13761	0,011	Corto	1,666
GB17056	0,011	Cyclophilin 1	1,662
GB15291	0,011	ATP synthase- γ chain	1,662

(Continua)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB16464	0,011	Malate dehydrogenase 2	1,662
GB16918	0,012	Threonyl-tRNA synthetase	1,661
GB15016	0,012	Heat shock 70-kDa protein cognate 3	1,653
GB13380	0,013	Chickadee	1,645
GB15053	0,013	Regulatory particle triple-A ATPase 1	1,638
GB19724	0,013	Eukaryotic initiation factor 4a	1,637
GB16601	0,014	Toutatis	1,635
GB15168	0,014	Vap-33-1	1,629
GB18969	0,014	Heat shock protein 60	1,624
GB13888	0,015	Eukaryotic initiation factor 3 p66 subunit	1,621
GB12338	0,015	Ribosomal protein LP0	1,620
GB13539	0,016	Dim γ -tubulin 1	1,601
GB10899	0,016	Annexin B9	1,600
GB15026	0,016		1,592
GB19923	0,016	Cysteine proteinase-1	1,591
GB13368	0,017		1,586
GB17681	0,017	Actin 5C	1,585
GB14569	0,017	Insulin degrading metalloproteinase	1,582
GB10238	0,017	ERp60	1,578
GB17917	0,018		1,570
GB11820	0,019	Inositol polyphosphate 1-phosphatase	1,567

(Continua)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB13770	0,019	FK506-binding protein FKBP59	1,562
GB10258	0,019	ϵ COP	1,560
GB19041	0,020	Snf5-related 1	1,558
GB17282	0,020	Calreticulin	1,552
GB19048	0,021		1,549
GB19293	0,021	Cytochrome c proximal	1,548
GB17347	0,021	C-type lectin 27kD	1,546
GB12382	0,022	Autophagy-specific gene 6	1,536
GB10498	0,024	Peroxiredoxin 2540-1	1,525
GB11892	0,024	Glycogen phosphorylase	1,523
GB19860	0,025	Heat shock protein cognate 5	1,519
GB15962	0,026		1,515
GB20036	0,026	Synaptotagmin 1	1,514
GB19359	0,026	Clathrin heavy chain	1,512
GB10237	0,027	Still life	1,508
GB12649	0,027	β amyloid protein precursor-like	1,507
GB17348	0,027	p24-related-1	1,505
GB18952	0,028		1,501
GB18318	0,029		1,495
GB12089	0,029		1,494
GB16972	0,029	Nipsnap	1,493
GB14205	0,030		1,484
GB16614	0,031	Regulatory particle non	1,482

(Continua)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB14328	0,031		1,478
GB19283	0,032	Calcineurin B2	1,475
GB15245	0,032		1,470
GB15186	0,033	Nedd4 family interacting	1,469
GB19373	0,033	Dipeptidyl aminopeptidase III	1,468
GB17836	0,034	Vacuolar H ⁺ ATPase PPA1 subunit 1	1,466
GB13654	0,034		1,466
GB19284	0,034	La related protein 7	1,466
GB15226	0,034	Vacuolar H ⁺ ATPase 36kD subunit 1	1,463
GB19171	0,035	Vacuolar H ⁺ -ATPase 55kD subunit	1,459
GB18891	0,035		1,458
GB15807	0,035		1,455
GB10155	0,035	Eukaryotic initiation factor 2 β	1,455
GB17820	0,036	Origin recognition complex subunit 1	1,452
GB20013	0,036	Regulatory particle triple-A ATPase 4	1,450
GB11260	0,037	Regulatory particle non-ATPase 5	1,448
GB14852	0,037	Heat shock protein cognate 4	1,447
GB10514	0,037	α -Tubulin at 84B	1,446
GB10406	0,038		1,445
GB10675	0,038	ADP ribosylation factor	1,443

(Continua)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB14863	0,038	Microtubule star	1,442
GB15362	0,039		1,438
GB15204	0,039	Phosphatidylserine receptor	1,437
GB11283	0,040	Tal	1,434
GB14791	0,040	Bellwether	1,434
GB18311	0,040		1,434
GB14678	0,041	Regulatory particle triple-A ATPase 5	1,432
GB15694	0,041	UBPY ortholog	1,431
GB19578	0,042	PTEN-induced putative kinase 1	1,429
GB16864	0,042	Mitochondrial trifunctional protein α subunit	1,426
GB10294	0,042		1,424
GB17247	0,043		1,424
GB16142	0,043		1,422
GB11177	0,043	eEF1 δ	1,420
GB13529	0,044	Stambha A	1,419
GB16276	0,046	Small ribonucleoprotein particle protein SmB	1,414
GB11272	0,047	β subunit of type II geranylgeranyl transferase	1,410
GB12113	0,047	Porin	1,408
GB13119	0,047	β -coatomer protein	1,407
GB14115	0,047		1,407

(Conclusão)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB15744	0,048		1,403
GB19861	0,049	Katanin 60	1,401
GB18046	0,049		1,400
GB11393	0,049		1,400
GB16998	0,050	Maternal expression at 31B	1,399
GB13213	0,050	Eukaryotic translation initiation factor 4G	1,399
GB18446	0,050	Ypsilon schachtel	1,399
GB19881	0,050	Eb1	1,398

Tabela 1 B- Representa os genes diferencialmente expressos com uma amostra de 20 µg de amostra de RNA de cérebro. Todos os genes mais expressos são da casta de operárias.

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB13529	0,003	FK 506 binding protein 2	1,843
GB17804	0,003	Lethal (1) GO144	1,836
GB15291	0,006	ATP synthase- γ -chain	1,686
GB18839	0,008	Tumbleweed	1,643
GB15500	0,009	Adenosine3	1,629
GB16918	0,009	Threonyl-tRNA synthetase	1,627
GB17050	0,012	Caliban	1,584
GB16890	0,014	Mitoferrin	1,559
GB15682	0,014	Ariadne	1,558

(Continua)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB12886	0,017	Sec6	1,520
GB13596	0,017	ATP synthase- β	1,519
GB19580	0,019	Syntaxin 1	1,507
GB18984	0,019	Lethal(2) K12914	1,505
GB12758	0,019	Hephaestus	1,501
GB11132	0,021	Ribosomal protein S5a	1,490
GB17785	0,023	Nedd 8	1,469
GB19494	0,026	Ribosomal protein L27A	1,451
GB16692	0,027	Cuticular protein 100 A	1,442
GB11839	0,028	Misshapen	1,438
GB16592	0,030	Rabaptin 5 associated Exchange fator for Rab 5	1,423
GB12209	0,030	Mutagen sensitive 209	1,422
GB10238	0,031	ERp60	1,417
GB18463	0,031	NUCB1	1,417
GB15877	0,032	Small ribonucleoprotein particle protein SnF	1,416
GB12205	0,033	Supercoiling factor	1,407
GB16844	0,034	Elongation factor 1 α 48D	1,404
GB12097	0,036	Nessun dorma	1,392
GB12361	0,037	Ribosomal protein L24	1,391
GB17958	0,038	Axotactin	1,386
GB20152	0,039	Oligosaccharide transferase A subunit	1,385
GB12921	0,039	Cwc25	1,385
GB14490	0,041	Ciboulot	1,376
GB10769	0,042	Mitochondrial transcription Factor B1	1,370
GB30258	0,042	Vacuolar protein sorting	1,369

(Conclusão)

ID	p-valor	Proteína codificada pelo ortólogo em <i>D.melanogaster</i>	Fold-Change
GB11983	0,044	Angiotensin converting enzyme	1,361
GB16449	0,044	Pi4KII α	1,361
GB16671	0,045		1,358
GB19138	0,046	Methal response element- binding Transcription Factor 1	1,356
GB14918	0,046		1,355