

**Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

**Expressão gênica no desenvolvimento adulto de operárias de *Frieseomelitta varia***

**Michael Christopher Jaskot**

**São Carlos, SP  
-2018-**

**Michael Christopher Jaskot**

**Expressão gênica no desenvolvimento adulto de operárias de *Frieseomelitta varia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes

**São Carlos, SP  
-2018-**

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

**Apoio financeiro:**

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Michael Christopher Jaskot, realizada em 04/06/2018:

---

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes  
UFSCar

---

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti  
UFU

---

Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi  
USP

## AGRADECIMENTOS

Tudo o que consegui aqui não poderia ter sido feito sem a ajuda de várias pessoas e instituições nos últimos dois anos. Acredito firmemente que todos, em qualquer campo ou profissão, precisam da assistência e orientação de outros para realizar até mesmo os objetivos mais básicos - não vivemos em vácuo - as ações de um afetam a vida de todos. Primeiro, gostaria de agradecer a minha maravilhosa esposa e melhor amiga, Pamela, que me acompanhou nesta jornada de pós-graduação. Hoje, ela verá a minha felicidade. Eu não poderia ter concluído este curso com nenhuma outra pessoa como cônjuge.

Aos meus pais incríveis, Chester e Carolynn, que sacrificaram tanto, antes mesmo de eu nascer, para me ver feliz na vida. Quer se trate de apoio emocional ou financeiro, elogios ou críticas, seu amor não tem limites e meus objetivos não significariam nada sem essas duas pessoas. Minha extensa família também me deu anos de apoio, com um agradecimento especial ao meu tio Doutor Robert Jaskot, que sempre me encantou com histórias científicas, e minha querida tia Mary, que me ensinou como ser uma pessoa mais atenciosa e saudável.

Há inúmeras pessoas na UFSCar que todos os dias me ajudaram a aproximar-se cada vez mais da conclusão do meu trabalho. Pelo apoio técnico-científico e infraestrutura, gostaria de agradecer às seguintes pessoas: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama e toda equipe de seu lab, Dra. Katia Ferreira, Isabel Godoy, Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur e toda a equipe de seu lab, MSc. Vinicius Marquioni, Regina Câmara, Prof. Dr. Flavio Henrique Silva e toda equipe de seu lab, Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha e toda a equipe de seu lab. Agradeço a Ivanildes Menezes por estar sempre disponível para responder a inúmeras perguntas sobre o PPGGEv, e a Dona Cileide por manter um edifício limpo e organizado, sempre propício à aprendizagem. Agradeço ao Matheus Pedrino e à Fernanda Sanches, do Nunes lab, por toda a ajuda que me deram, bem como à Luana Bataglia (ex-aluna do Nunes lab) por estar sempre disponível para responder perguntas sobre himenópteros e bioinformática (anotação de genes).

Sou grato à CAPES por me fornecer uma bolsa de estudos capaz de sustentar minha família por dois anos, e ao povo do Brasil por permitir que um estrangeiro como eu estudasse em uma instituição federal, sem nenhum custo, e por me tratar com total respeito. Agradeço também ao CNPq, pois os recursos financeiros que deram suporte ao desenvolvimento deste trabalho foram oriundos de Projetos Universal, processos no. 461711/2014-1 e 454103/2014-0. Este último, coordenado pela Profa. Dra. Márcia M. G. Bitondi (FFCLRP-USP), tratou-se de um consórcio nacional para sequenciamento e análise do genoma de *F. varia*. Somos muito gratos por todo o apoio recebido do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento de Abelhas (LBDA-USP), em especial das Profas. Dras. Márcia Bitondi e Zilá Simões. Agradeço ao Dr. Tiago Falcón Lopes (HCPA-UFRGS) e a Profa. Márcia Bitondi por nos permitirem usar os dados de RNA-seq de *F. varia*, e ao Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro (FCAV-UNESP) pela prontidão e análises de bioinformática, os quais enriqueceram o trabalho. Também agradeço à Profa. Dra. Anete Pedro Lourenço (UFVJM) por compartilhar informações científicas, dicas e reagentes. Nossos agradecimentos também ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares (FMRP-USP) por manter o meliponário e permitir as coletas de *F. varia*, bem como, ao técnico Jairo de Souza e ao doutorando Ivan de Castro por toda a presteza e paciência em nos ajudar na obtenção das amostras (que demandam tempo).

Há mais uma pessoa que eu preciso agradecer, Professor Doutor Francis de Moraes Franco Nunes. Não dá para fazer um mestrado sem orientador, e com ele me ajudando e ensinando, o sonho foi realizado. Ele é dedicado ao sucesso de seus alunos e sempre fará tudo possível em nome da pesquisa. Seus futuros alunos terão a sorte de estar sob sua supervisão. Eu realmente agradeço a ele por seu esforço, paciência, conhecimento e amizade.

Alguns outros também contribuíram indiretamente para o meu sucesso, apresentando-me à pesquisa, ao poder da ciência ou ao orgulho de ter uma mente aberta e livre: o Doutor James Chiucci, o Matthew Higgins e inúmeros outros que encontrei na minha vida profissional. Ninguém jamais consegue algo sozinho - a biologia fornece um exemplo perfeito disso - no debate de *nature vs. nurture*. Eu sempre tenho tido um amor e uma paixão pela beleza da natureza, mas eu não estaria em lugar nenhuma sem a ajuda externa de outros, o *nurture*.

**E**u acredito que uma das características da raça humana, possivelmente aquela que é a principal responsável por seu curso de evolução, é que ela cresceu, respondendo criativamente ao fracasso.

- Glenn T. Seaborg, químico Americano

## RESUMO

---

O declínio global de polinizadores serviu de estímulo para o amplo estudo dos himenópteros. Os processos moleculares que controlam as vias de desintoxicação e antioxidantes são de suma importância para os insetos que estão em contato com as possíveis causas desses declínios: pesticidas, xenobióticos e patógenos. Himenópteros como a *Apis mellifera* foram minuciosamente estudados em relação à sua genética e títulos de hormônios. Investigamos se características moleculares semelhantes são encontradas em abelhas eusociais menos frequentemente usadas em polinização comercial. O fenômeno do polietismo temporal, presente em numerosas espécies de abelhas, também pode ser investigado em relação à modulação da expressão genética durante a progressão do desenvolvimento dos indivíduos adultos. Os níveis de expressão genética entre as vias de desintoxicação, degradação xenobiótica, antioxidante, defesa, desenvolvimento e envelhecimento na abelha sem ferrão do gênero *Frieseomelitta* não foram estudados até o momento, e informações específicas ligadas a esses processos são ainda desconhecidas pela ciência. Nesta pesquisa, as variações da expressão gênica de genes de diferentes famílias e categorias funcionais (relacionados à progressão do desenvolvimento adulto (longevidade/envelhecimento) e/ou envolvidos com mecanismos gerais de defesa (detoxificação/xenobióticos, antioxidantes e sistema imunológico)) foram investigadas em operárias da abelha *Frieseomelitta varia* por meio de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) semiquantitativa em três grupos etários: operárias novas (~ 0-5 dias), intermediárias (~ 12-19 dias) e forrageiras (~ 29-50 dias). *P450 6aql* exibiu expressão uniforme nos três grupos, porém dois genes da mesma família que são participantes na via de ecdysone, *shade* e *spook* foram up regulados em abelhas novas. Os antioxidantes *sod* e *cat* foram expressos com o mesmo padrão de ser up regulados em abelhas novas e intermediárias. *Relish* e *dorsal*, fatores de transcrição nas vias de defesa, também mostraram expressão igual e foram up regulados em abelhas novas. Níveis altos dos transcritos de *gst-s1* e *gst-s4* foram encontrados, significando que nos três grupos etários as vias de detoxificação são ativas. Também foram analisados dados de transcriptoma (RNA-seq, Illumina) de tegumento de operárias recém-emergidas e forrageiras. Dados de RT-PCR e RNA-seq demonstram que o comportamento molecular de alguns genes encontrados em outras espécies, como *A. mellifera*, é similar ao observado em *F. varia*. Coincidindo com a literatura científica, encontramos que o gene codificador da esterase do hormônio juvenil (*juvenile hormone esterase, jhe*) é expresso em níveis semelhantes em abelhas novas e intermediárias e ambos comparativamente mais altos do que em forrageiras. O gene codificador de vitelogenina (*vitellogenin, vg*) mostrou-se bastante expressa na fase intermediária, comparado aos níveis mais basais encontrados em operárias mais novas e em forrageiras. Estes dados sugerem que a hipótese do duplo repressor entre o hormônio juvenil e a *vg*, descrita para *A. mellifera*, também seja válida para operárias adultas de *F. varia*. A análise dos dados de RNA-seq teve foco nas famílias *P450*, *GST* e *CCE*, bem como outros constituintes das vias de desenvolvimento, genes antioxidantes e do sistema imunológico. Constatou-se que a maioria dos genes do clado *P450* analisados são up regulados em forrageiras, sugerindo que estes exercem papéis mais evidentes nos processos de desintoxicação do que de desenvolvimento. Dois dos três genes *GST* pesquisados foram altamente regulados em adultas recém-emergidas. A expressão de genes antioxidantes variou bastante, sugerindo papéis específicos para cada proteína em um determinado estágio de desenvolvimento do tegumento. A expressão dos genes do desenvolvimento também variou, mas alguns dos genes pesquisados, *chico*, *foxo*, *calponina* e *kruppel* sugerem um circuito molecular com expressão interdependente. Os genes *hexamarin-110* e *hexamarin-70b* são extremamente up reguladas em adultas recém-emergidas, concordando com seu papel conhecido no armazenamento de aminoácidos para facilitar o crescimento durante os demais estágios adultos. Já a regulação de genes de resposta imunológica e de defesa mostrou-se mais efetiva em forrageiras, reforçando que esses fenótipos dependem de níveis mais altos de peptídeos antimicrobianos (*AMPs*) para se defenderem de patógenos e outras formas de estresse em virtude dos comportamentos fora das colmeias. O uso da *F. varia* na pesquisa mostrou a importância de compreender os processos genéticos em todos os himenópteros, acrescentando informações valiosas aos dados conhecidos para espécies mais estudadas, como *A. mellifera*.



## ABSTRACT

---

Global declines in pollinators have served as the impetus for the widespread study of hymenopterans. The molecular processes controlling detoxification and antioxidant pathways are of supreme importance to insects that are in contact with the possible causes of these declines, such as pesticides, xenobiotics and pathogens. As hymenopterans such as *Apis mellifera* have been thoroughly studied with regards to their genetics and hormone titers, we desired to uncover if similar molecular characteristics are found in less-frequently managed eusocial bees. The phenomenon of temporal polyethism, present in numerous bee species, can also be investigated with regard to the modulation of genetic expression across age and task groups. However, the levels of genetic expression among detoxification, xenobiotic degradation, antioxidant, defense, developmental and ageing pathways in the Brazilian stingless bee *Frieseomelitta varia* are not studied and specific information pertaining to these processes are generally unknown to science. In this study, variations in the genetic expression of genes from different families and functional categories (related to the progression of adult development (longevity/ageing) and/or involved in the general mechanisms of defense (detoxification/xenobiotics, antioxidants and the immune system)) were investigated in workers of the bee *Frieseomelitta varia* by means of semiquantitative RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction) in three age groups: new workers (~ 0-5 days), intermediates (~ 12-19 days) and foragers (~ 29-50 days). *P450 6aql* showed uniform expression in the three groups, while two genes from the same family, shade and spook, were up regulated in new bees. The antioxidants *sod* and *cat* were expressed with the same pattern of up regulation in new and intermediate bees. Relish and dorsal, transcription factors in defense pathways, were up regulated in new bees. High levels of *gst-s1* and *gst-s4* transcripts were found, signifying that in the three groups detoxification pathways are active. Transcriptome data was also analyzed (RNA-seq, Illumina) using the integument of recently-emerged workers and foragers. RT-PCR and RNA-seq data demonstrate that the molecular behavior of some genes found in other species, such as *A. mellifera*, is similar to what is observed in *F. varia*. Coinciding with scientific literature, the gene coding for juvenile hormone esterase (*jhe*) is expressed in similar levels in new and intermediate bees, and both significantly more expressed than in foragers. The gene coding for vitellogenin (*vg*) showed to be greatly expressed in the intermediate phase, compared to the lower levels found in new and foraging bees. Such data suggest that the double repressor hypothesis of juvenile hormone and *vg*, described in *A. mellifera*, is also valid for *F. varia* adults. RNA-seq data was also compiled and analyzed for *P450*, *GST* and *CCE* families as well as other detoxification and metabolic pathway constituents. *P450* genes were generally found to be up regulated in foragers, suggesting more of a detoxification role rather than developmental. Two of the three *GST* genes surveyed were found to be highly up regulated in newly emerged adults. Expression of antioxidant genes varied greatly, suggesting specific roles for each protein at a certain developmental stage. Expression of developmental genes also varied, yet several of the gene surveyed, *chico*, *foxo*, *calponin* and *kruppel* were concomitantly expressed do to their interdependence in molecular circuitry. Genes such as *hexamarin-110* and *hexamarin-70b* were found to be extremely up regulated in newly emerged adults, agreeing with their known role in amino acid storage to facilitate growth during adult stages. Of great interest was the almost universal up regulation of immune response and defense genes in foragers, bolstering the assertion that these individuals will need higher levels of antimicrobial peptides (AMPs) to defend themselves from pathogens located outside of the hive. The use of *F. varia* in research has shown the importance of understanding the genetic processes in all hymenopterans, while adding information to the data of already well-known species, such as *A. mellifera*.

## SUMÁRIO

---

1.	Introdução .....	13
2.	Material e Métodos .....	11
2.1	Identificação de diferentes categorias de genes no genoma de <i>Frieseomelitta varia</i> .....	12
2.2	Anotação da estrutura gênica e desenho de oligonucleotídeos específicos.....	13
2.3	Material biológico .....	16
2.4	Avaliação de Expressão Gênica.....	18
2.4.1	Extração de RNA Total .....	18
2.4.2	Síntese de cDNA .....	19
2.4.3	Extração de DNA genômica (gDNA) .....	20
2.4.4	PCR semiquantitativa e análise estatística .....	20
2.4.5	Análise de RNA-seq de tegumento de operárias adultas .....	22
3.	Resultados e Discussão .....	24
3.1	Levantamento de literatura e genes candidatos .....	25
3.2	Anotação dos genes analisados por densitometria .....	26
3.3	Validação de modelos gênicos.....	28
3.4	Análise de potenciais genes de referência .....	29
3.5	Avaliação de expressão gênica .....	30
4.	Referências Bibliográficas .....	51
5.	Anexo .....	65

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1: Operárias adultas da abelha *F. varia* em diferentes fases ao longo do tempo e características utilizadas para coleta.....16
- Figura 2: Colônias de *F. varia* localizadas no Meliponário da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, utilizadas para coleta de material biológico. Da esquerda para a direita, colônia 1 a 5, respectivamente.....17
- Figura 3: Estrutura dos genes codificadores das 15 proteínas estudados por gel densitometria. Os retângulos representam os éxons e as linhas os íntrons. O tamanho dos éxons, em pares de base (pb), está representado acima de cada retângulo. O tamanho dos íntrons, e em pares de base (pb), está representado abaixo de cada linha. A cor laranja representa o amplicon de cada gene, com um *primer* localizado em cada extremidade do amplicon. O códon de iniciação (ATG) está localizado no começo do lado 5' e códon de terminação (TAA, TGA ou TAG) está localizado no último exon do lado 3' .....28
- Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo produtos de PCR (amplicons) gerados a partir de moldes de DNA genômico (gDNA) e DNA complementar (cDNA) para os genes *cyp shade*, *hsp90*, *jhe* e *vg*. CN é o controle negativo (branco) sem adição de qualquer molde. M – marcador de peso molecular (100 pb) .....28
- Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo amplicons de PCR (gDNA) e de RT-PCR (cDNA) dos genes *ef1a*, *tbpa* e *rpl32* em amostras de operárias de *F. varia* novas (N), intermediárias (I) e forrageiras (F). CN é o controle negativo (branco) sem adição de qualquer molde. As setas à esquerda e à direita indicam, respectivamente, os tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) de cDNA e gDNA. C1 a C5 indicam amostras provenientes de colônias 1 a 5. Observação: a falta de banda em poço Fg C5 de *rpl32* não é um polimorfismo, mas uma falha consistente nessa amostra.....29
- Figura 6: Perfil de expressão (por RT-PCR (cDNA)) dos genes *ef1a* (em verde), *tbpa* (em vermelho) e *rpl32* (em azul) em amostras de operárias de *F. varia* novas (N), intermediárias (I) e forrageiras (F). C1 a C5 indicam amostras provenientes de colônias 1 a 5. Os dados foram mensurados por densitometria ótica e os valores correspondem a unidades arbitrárias. Como a amostra Fg C5 faliu e não exibiu banda no gel, o valor da expressão neste gráfico reflete o background da amostra.....30
- Figura 7: Expressão gênica (mRNA) semiquantitativa (RT-PCR) de doze genes selecionados neste estudo. Os níveis de expressão foram mensurados por densitometria ótica a partir dos volumes ajustados de pixels de cada banda (amplicon) observada por eletroforese em gel de agarose 1%, e normalizados pela expressão do gene *tbpa* para cada amostras de operárias de *F. varia* - novas (N, n=5), intermediárias (I, n=5) e forrageiras (F, n=5). Nas barras azuis estão representadas as média de expressão de cada gene em cada grupo e o erro padrão. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas pela análise *One-Way ANOVA* e *Tukey Post-Hoc* ( $p<0,05$ ).....34

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1: Lista de cada gene estudado, seu GENEID e os <i>primers</i> Forward e Reverse.....	14
Tabela 2: Condições usadas nas PCRs para a amplificação dos genes estudados - temperatura de anelamento dos <i>primers</i> , número de ciclos e concentração de cDNA (concentrado = 200 ng/μL e diluído 10X =20 ng/μL). .....	21
Tabela 3: Síntese de informações sobre 143 genes de interesse do presente estudado.....	25
Tabela 4: Categorias de genes estatística (q-value<0,05) e diferencialmente expressos entre os transcriptoma de tegumentos de operárias recém emergidas e forrageiras de <i>F. varia</i> , analisados por RNA-seq. As contagens estão em normalizadas FPKM e níveis de expressão relativos estão expressos pelo Log 2 do Fold-Change (Log2 FC). Vermelho indica genes mais expressos (up regulados, Log2 FC positivo) em RE em comparação a Fg, enquanto verde indica genes menos expressos (down regulados, Log2 FC negativo) em RE em comparação a Fg. ....	35



# **1. Introdução**

## INTRODUÇÃO

---

### Motivações

A apicultura é uma atividade muito importante na economia global, pois promove a polinização que, por sua vez, é vital para a produção e manutenção de ecossistemas e de uma variedade de culturas agrícolas, muitas das quais são utilizadas pelo homem para consumo (Klatt et al. 2014, Bauer et al. 2016). De todos os insetos sociais estudados, nenhum é mais usado para fins econômicos do que a abelha, *Apis mellifera* (Potts et al. 2010). No entanto, declínios recentes em populações destas abelhas devido a um fenômeno misterioso e mal compreendido conhecido como Desordem do Colapso das Colônias (CCD) (Cornman et al. 2012, VanEngelsdorp & Meixner 2010) ajudaram a enfatizar a necessidade do uso de outras espécies de abelhas para os serviços de polinização comercial (Canto-Aguilar & Parra-Tabla 2000).

Aproximadamente 500 espécies de abelhas compõem a tribo Meliponini, um grupo frequentemente chamado de “abelhas sem ferrão” (Cruz-Landim 2000, Aleixo et al. 2013), pois cada espécie exibe um ferrão vestigial ou atrofiado (Roldão 2011). Os Meliponini são frequentemente usados para produção de mel em pequena escala e polinização em toda a América Latina (Cruz Lopéz et al. 2002, Nunes et al. 2009, Costa et al. 2012). No Brasil, povos indígenas, meliponicultores, agricultores e pequenas empresas têm usado abelhas nativas por gerações, para manejo, produção de mel e outros produtos (própolis, geoprópolis e pólen) e, também, para polinização, muitas vezes com resultados incrivelmente produtivos (Kerr et al. 1996; Silva & Lima da Paz, 2012).

A espécie de abelha *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836) é um membro neotropical da tribo Meliponini. De acordo com o Catálogo de Abelhas Moure (<http://moure.cria.org.br/catalogue>, Camargo & Pedro, 2013), a espécie encontra-se distribuída geograficamente em parte da Bolívia (região de Santa Cruz) e em alguns estados do Brasil (Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Minas Gerais e São Paulo). Uma colmeia típica de *F. varia* pode ser encontrada em troncos (ocos) de árvores vivas ou mortas, seja em áreas rurais ou urbanas, e percorrem grandes distâncias em busca de

## INTRODUÇÃO

---

alimentos (Nogueira-Neto 1997, Marquez-Souza 2010, Aleixo et al. 2013). A abelha *F. varia* também é conhecida no Brasil como a "marmelada" por causa de seu mel denso (e menos aquoso que de outras abelhas nativas) (Crúz Lopez et al. 2002). Dependendo da região, é também popularmente chamada de “marmelada amarela brava”, “moça branca” ou “manuel d’abreu”. O mel de *F. varia* é muitas vezes alvo de roubos por abelhas saqueadoras (como da espécie *Lestrimelitta limao*) que tentam invadir a colmeia, necessitando que vários indivíduos de “marmelada” comportando-se como guardas se posicionem num único e pequeno orifício na entrada da colônia, para protege-la (Couvillon & Ratnieks 2008).

Como na maioria dos insetos sociais, uma única rainha de *F. varia* é responsável pela reprodução das colônias, enquanto as operárias exibem polietismo etário por meio do desempenho de várias tarefas dentro e fora da colônia. Enquanto as fêmeas (rainhas e operárias) originam-se de ovos fertilizados (diploides), os machos desenvolvem-se a partir de ovos não fertilizados (haploides) e os zangões adultos possuem função de reprodução, podendo se acasalar com rainhas virgens (Kerr et al. 1996, Cruz-Landim 2000). Diferentemente da *A. mellifera*, as larvas de rainhas em desenvolvimento não vivem em células de cria maiores ou recebem maiores quantidades de geleia real rica em nutrientes. Em vez disso, elas recebem e consomem os mesmos nutrientes das larvas de operárias, porém em dose extra proveniente de célula de cria adjacente (revisado por Hartfelder et al. 2006).

Uma diferença marcante entre operárias de *A. mellifera* e *F. varia* diz respeito ao *status* reprodutivo de operárias. Em *A. mellifera*, as operárias são facultativamente estéreis, ou seja, são capazes de ativar os seus ovários e fazer postura de ovos haploides quando não há uma rainha na colônia (Winston, 1991). Já as operárias de *F. varia* não apresentam capacidade reprodutiva, mesmo em condição de orfandade da colônia (Terada 1974, Da Cunha et al. 1986, Da Cunha et al. 1989, Da Cunha & Campos 1993). Esta esterilidade definitiva observada em operárias de *F. varia* deve-se à degeneração do germário e outras regiões dos ovários em função de processos de morte celular que

## INTRODUÇÃO

---

ocorrem a partir da fase pupal e que, conseqüentemente, desorganizam a estrutura dos ovários (Boleli et al. 1999, 2000). Desta forma, e diferentemente de outras abelhas sem ferrão, as operárias de *F. varia* também não produzem ovos tróficos para alimentar a rainha (Kerr et al., 1996).

Não apenas o desenvolvimento do sistema reprodutivo, mas, também, toda a ontogênese dos insetos sociais são precisamente regulados por um *crosstalk* entre programação genética e níveis hormonais, os quais podem sofrer influência de condições internas e externas às colônias (Eyer et al. 2017). Os principais hormônios, hormônio juvenil (HJ) e ecdisteroides (como a 20-hidroxicdisona [20E]) atuam de forma coordenada em diversos eventos, tais como a diferenciação de castas nas abelhas (Barchuk et al. 2002, Barchuk et al. 2007), as mudas larvais (larva-larva), metamórficas (larva-pupa) e imaginal (pupa-adulta) (Dubrovsky, 2005), e o comportamento e a longevidade em adultos (Page & Amdam, 2007; Wang et al. 2012).

A longevidade e, conseqüentemente, o envelhecimento são áreas que despertam grande interesse científico e são alvos de muitos estudos genéticos, em humanos e outras espécies. Os animais invertebrados têm sido usados para pesquisas nestas áreas, visto que geralmente possuem um ciclo de vida curto, são de fácil manipulação e produzem um grande número de descendentes numa única geração (Wilson et al., 2013). A plasticidade fenotípica, o polietismo etário e as alterações no conteúdo de suas dietas também são atributos importantes que fazem das abelhas sociais excelentes modelos para se investigar as mudanças biológicas (morfologia, (epi)genética, fisiologia etc.) e respostas às variações ambientais ao longo do tempo (avanço da idade) (Keller & Jemielity 2006, Mackert et al. 2008, Aurori et al. 2013, Yan et al. 2014, Corona et al. 2016). Operárias de *F. varia* vivem em torno de 55 dias (Faustino et al. 2002) a 61 dias (Figueiredo et al. 2002), mas a idade máxima observada foi de 82 dias (Cardoso 2010).

A regulação (epi)genética é um dos principais motores da evolução da organização social em insetos (Johnson & Linksvayer 2010, Simola et al. 2013). A socialidade evoluiu de forma



## INTRODUÇÃO

---

independente, várias vezes e em vários grupos de insetos, e envolveu um aumento na complexidade da regulação de redes gênicas, por metilação e/ou por elementos genéticos *cis*, *trans* e não-codificadores (Simola et al. 2013, Kapheim et al. 2015). Dados de transcriptomas de *F. varia* e também de outras abelhas suportam a hipótese do “*Genetic Toolkit*”, que assume que tanto as linhagens solitárias (ancestrais) quanto aquelas que vivem em grupo (sociais) apresentam um mesmo conjunto de genes que desempenham funções altamente conservadas (Woodard et al. 2011, Kapheim 2016). Estes genes, responsáveis pelo desenvolvimento, pela fisiologia e pelo comportamento, entre outros processos, sofreram mudanças evolutivas na regulação da expressão espaço-temporal, responsáveis pela diversificação da socialidade (Kapheim 2016).

As adaptações às variações ambientais podem ser percebidas e reguladas por mecanismos epigenéticos. Sobre a epigenética de abelhas, sabe-se que *A. mellifera* possui todo o repertório de DNA metiltransferases (*dnmt1a*, *dnmt1b*, *dnmt2* e *dnmt3*), semelhante ao que se observa em humanos e outros mamíferos (Wang et al. 2006). Além do papel na diferenciação de castas (Kucharski et al. 2008, Shi et al. 2013) de *A. mellifera*, mudanças nos padrões de metilação de DNA também estão associadas às diferenças de comportamento (nutridora x forrageira) e ao avanço da idade (13 dias x 29 dias) de operárias adultas da mesma espécie (Lockett et al. 2012). Os níveis globais de metilação de DNA de operárias da espécie *Melipona scutellaris* (Meliponini) se mostraram sutilmente diferentes entre as idades e comportamentos (recém-emergidas, nutridoras e forrageiras) analisados (Cardoso-Júnior et al. 2017). Em *F. varia*, ao menos cinco modelos gênicos preditos foram anotados como DNA metiltransferases (Carlos Cardoso-Júnior, comunicação pessoal), também sugerindo uma maquinaria epigenética completa nesta abelha.

Além disso, a redução química de radicais livres (especialmente as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs), ou ROS em inglês) pode afeitar positivamente a longevidade de uma espécie (Sohal & Orr 2012), uma vez que estas moléculas causam danos estruturais aos componentes

## INTRODUÇÃO

---

celulares (Carocho & Ferreira 2012), sejam em organelas ou em macromoléculas (lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas etc.) (Hekimi et al. 2011). Os radicais livres são produtos da respiração aeróbica normal, quando o oxigênio ( $O_2$ ) é reduzido a superóxido ( $O_2^-$ ). Superóxidos instáveis, ricos em elétrons, são uma ameaça às células e aos organismos como um todo. Portanto, mesmo que espécies reativas de oxigênio sejam continuamente geradas nas mitocôndrias, a célula e o indivíduo devem reduzir os danos às estruturas celulares necessárias por meio do uso de antioxidantes. As enzimas superóxido dismutase (*sod*), catalase (*cat*) e Glutathione S-Transferase (*gst*) são componentes dos sistemas antioxidantes (Corona & Robinson 2006).

Um outro aspecto importante ao contexto social e à progressão da vida adulta das abelhas diz respeito aos mecanismos gerais de defesa, que abrangem desde o sistema imunológico (resposta a peptídeos antimicrobianos, reconhecimento de microrganismos, fagocitose, melanização, coagulação, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), cicatrização, sequestro de ferro) até os sistemas antioxidantes e os de detoxificação a agentes xenobióticos.

Toll é uma das importantes vias de defesa imunológica de insetos. Sua atuação envolve uma série de reações enzimáticas em cascata envolvendo enzimas como *dorsal* e *cactus*, bem como peptídeos antimicrobianos (AMPs, como *defensin*), para combater invasões de bactérias e fungos (Evans et al. 2006). A via do Imd, também presente em muitos insetos (Myllymaki et al. 2014), baseia-se nos mesmos princípios de Toll e, ainda, recruta a enzima *relish* como intermediário para eventualmente produzir peptídeos antimicrobianos (Schluns & Crozier 2007). Ambas as vias também estão implicadas no recrutamento de profenoxidase (PPO), um candidato efetor no processo de melanização (Evans et al. 2006), que é uma forma de resposta imunológica ligada a coagulação e cicatrização de feridas no exoesqueleto (De Gregorio et al. 2002, Bilandazija et al. 2017).

A evolução e a diversidade dos mecanismos de defesa em insetos sociais é sempre um tema amplo e em constante debate. Em abelhas sociais poucos elementos transponíveis são encontrados

## INTRODUÇÃO

---

conferindo uma certa “imunidade natural” contra instabilidades genômicas (Kapheim et al. 2015). Outro fato curioso é que as abelhas sociais armazenam alimento (mel, pólen), tornando um ambiente propício para proliferação de microrganismos que podem (ou não) causar doenças (Evans et al. 2006). Por outro lado, as abelhas produzem própolis, um produto com alto potencial antibiótico, bem como o mel, a geleia real e o veneno também possuem atividade antibacteriana (Boukraâ & Sulaiman 2009). Entre as estratégias de defesa, também estão aquelas de caráter social (“imunidade social”, Claudianos et al. 2006, Le Conte et al. 2011), como o comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o comportamento higiênico (Rothenbuhler, 1964). Já foi mostrado que os indivíduos de *F. varia* que se comportam como guardas são capazes de usar sinais olfatórios para distinguir indivíduos da própria colônia daqueles provenientes de outras (Couvillon e Ratnieks, 2008). Além disso, alguns autores defendem que abelhas têm menos genes de resposta imunológica em comparação a outros insetos, como os Diptera (Claudianos et al. 2006). Isto retoma a questão da imunidade social que teria reduzido o número de patógenos ou, então, que promoveria um relaxamento da pressão seletiva para manutenção de genes de resposta imune no genoma. A quem defenda uma coevolução do sistema imune de entre abelhas para responder somente a um conjunto limitado de patógenos coevoluídos (Evans et al. 2006). Contudo, dados mais recentes de sequências genômicas apontam que moscas possuem um número exagerado de genes imunológicos, enquanto as outras ordens de insetos possuem números semelhantes aos de abelhas (Fischman et al. 2011). Em *F. varia*, foram identificados 174 modelos gênicos relacionados às principais vias de resposta imune (TOLL, IMD, JAK/STAT, RNAi) e outros 62 modelos gênicos foram identificados como codificadores de proteínas de reconhecimento, sinalização e efetoras de resposta imune (Anete Pedro Lourenço, comunicação pessoal).

Ainda ao que tange os mecanismos gerais de defesa, uma das maiores ameaças atualmente enfrentadas por todos os insetos em todo o mundo é o uso de pesticidas na agricultura (Potts et al. 2010, Goulson et al. 2015). Ainda que cada composto possa atuar de forma mais eficiente sobre

## INTRODUÇÃO

---

pragas alvo, qualquer inseto na vizinhança pode ser afetado por resíduos de pesticidas, esmo quando foram usados adequadamente e em baixas concentrações (Wu et al. 2011, Guedes et al. 2017).

Os efeitos de um pesticida podem ser monitorados, por exemplo, por investigação de transcriptomas de insetos, ou mais especificamente, a regulação positiva ou negativa de um gene em particular na presença/ausência destes produtos (Johnson et al. 2012, Alyokhin & Chen 2017).

A chance de sobrevivência de uma abelha quando exposta a pesticidas e xenobióticos dependerá, em última instância, de quão bem o inseto pode se desintoxicar, processando e destruindo substâncias nocivas. As vias moleculares essenciais para a redução de compostos prejudiciais no organismo, incluindo pesticidas em moléculas que podem ser mais facilmente excretadas, são bem estudadas e atualmente são de grande interesse para biólogos moleculares (Weirich et al. 2002, Claudianos et al. 2006, Corona & Robinson 2006, Evans et al. 2006, Gong & Diao 2016). A lógica indica que os pesticidas ativam genes que processam seus compostos tóxicos, permitindo que a abelha possa se desintoxicar. Uma espécie que é incapaz de processar eficientemente essas substâncias químicas pode ser mais suscetível aos seus efeitos nocivos e perecer. Da mesma forma, uma espécie que tenha uma melhor capacidade melhor de processar estes compostos pode ser uma opção para a polinização de culturas agrícolas, quando o uso de pesticidas é inevitável. Por outro lado, é possível que um pesticida possa regular negativamente alguns genes resultando em um declínio da fitness das abelhas. Estudos recentes confirmaram que pesticidas como o imidacloprida podem inibir a expressão de proteínas antimicrobianas (AMPs) (Tesovnik 2017), moléculas essenciais não apenas para a defesa de um inseto contra patógenos, mas também contra estresses xenobióticos, como pesticidas. Isso tem um efeito duplo: o pesticida encontrará menos moléculas detoxificantes na abelha hospedeira e, mais importante, a falta de AMPs gerará menor resistência dada a resposta enfraquecida do sistema imunológico.

A eficiência e a produtividade das abelhas nas tarefas diários, como o ato de voar (Christen et

## INTRODUÇÃO

---

al. 2016), também mostraram-se diminuir quando os pesticidas estão presentes (Cresswell 2011). Como as abelhas são os insetos sociais mais complexos, qualquer perturbação na divisão do trabalho ou tarefas rotineiras certamente afetará a colônia como um todo. Comportamentos improdutivos de forrageamento acabarão levando a uma menor coleta de néctar e pólen, o que claramente terá um impacto sobre a saúde e o desenvolvimento das crias e, conseqüentemente, contribuem para o declínio da colônia bem como da diversidade de uma ou mais espécies (Forfert 2017).

Os efeitos negativos dos pesticidas sobre *A. mellifera* são bem documentados (Potts et al. 2010, Tosi & Nieh 2017), enquanto os estudos de seus impactos sobre outras abelhas são escassos (Lima et al. 2016). Compreendendo melhor a expressão de genes de polinizadores pode ajudar na criação de uma base de informações moleculares e numa eventual possibilidade de substituir a abelha *A. mellifera* (em regiões onde elas estão em grande declínio) por outras espécies nativas, caso estas últimas se mostrem mais resistentes. Neste sentido, algumas famílias gênicas merecem destaque (a seguir).

A maioria dos citocromos P450 (*cyps*) estão envolvidas em processos catabólicos que degradam compostos xenobióticos, atuando, portanto, como um mecanismo de defesa (Scott 1999, Johnson et al. 2012, Mao et al. 2013). Mais especificamente, os P450s são importantes para as vias moleculares essenciais na degradação da nicotina e compostos relacionados à nicotina (Shi et al. 2009), o principal ingrediente dos pesticidas neonicotinoides, usados globalmente. O aumento na expressão nos genes de P450 implica em maior resistência a pesticidas (Oakeshott et al. 2003), pois um indivíduo com um número maior de proteínas P450 seria mais capaz de degradar molecularmente substâncias nocivas. Genes dessa família também pode ter papéis nas vias de biossíntese de proteínas ligadas à ecdise (Petryk et al. 2003; Namiki et al. 2005). Já as Glutathione-S-transferases são proteínas-chave que catalisam a degradação de xenobióticos e também participam de vias antioxidantes envolvidas na redução de radicais livres (Nebert & Vasiliou 2004, Corona et al. 2006, Gong & Diao

## INTRODUÇÃO

---

2016).

As Colina/Carboxilesterases (CCEs) também são enzimas essenciais para a detoxificação de xenobióticos (Claudianos et al. 2006). Curiosamente, a Esterase do Hormônio Juvenil (*jhe*) é uma CCE e catalisa a degradação do hormônio juvenil (HJ) (Mackert et al. 2008, Bordier et al. 2016), um composto vital no desenvolvimento de não apenas abelhas, mas de muitas ordens de insetos.

O monitoramento a expressão de genes e enzimas relacionados aos mecanismos gerais de defesa das abelhas (sistema imunológico, sistemas antioxidantes e sistemas de detoxificação a agentes xenobióticos) são fundamentais para se entender a biologia das espécies, a integração molecular que controla o desenvolvimento e a longevidade, bem como pode ajudar a prever ou mesmo diagnosticar a vulnerabilidade destes insetos às condições ambientais adversas. Nesta direção, o tegumento é um tecido alvo para estes estudos. A cutícula, também conhecida como exoesqueleto, é uma estrutura com multicamadas que ajuda na proteção contra a entrada de patógenos, na fixação de musculatura e nos movimentos, na retenção de água contra a dessecação, e outros processos fisiológicos, funcionando como um sensor na interação animal-ambiente. A cutícula é sintetizada a partir de secreções da epiderme e juntas (cutícula e epiderme) formam uma estrutura chamada tegumento (Hepburn 1985, Vincent & Wegst 2004). Algumas vezes, a idade de um inseto pode ser estimada em relação ao desenvolvimento e à pigmentação da cutícula (Santos et al. 2001). Estes processos estão sob controle e flutuações hormonais e podem ser acompanhados ao longo do desenvolvimento das larvas, das pupas e dos adultos dos holometábolos (Elias-Neto et al. 2010, Soares et al. 2011). Para cada estágio de crescimento na célula de cria, o inseto deve primeiro construir uma nova camada de cutícula, debaixo da atual, via melanização e esclerotização, e depois eliminar a cutícula externa por meio de um processo conhecido como ecdise (Anderson et al. 1981, Elias-Neto et al. 2008). Níveis diferentes de hormônios e proteínas respondem por essas mudanças estruturais, como o hormônio juvenil (HJ) (Zufelato et al 2000, Barchuk et al 2002). Compreender a biologia do tegumento, por

## INTRODUÇÃO

---

meio de dados transcriptômicos, poderá ajudar a elucidar as bases genéticas do desenvolvimento e maturação da cutícula, e os aspectos associados à longevidade e aos mecanismos de defesa.

Pelo exposto, hipotetizamos que as mudanças morfológicas, fisiológicas e comportamentais que ocorrem ao longo do desenvolvimento adulto de *F. varia* são acompanhadas pela expressão diferencial de genes chave, envolvidos nas vias de desenvolvimento e nos mecanismos gerais de defesa. Desta forma, os objetivos do presente trabalho foram:

1 - Fazer levantamento de literatura e listar genes potencialmente encontrados em diferentes vias moleculares de *F. varia*: genes de referência para estudos de expressão gênica, genes relacionados à progressão do desenvolvimento adulto (longevidade/envelhecimento), e genes envolvidos com mecanismos gerais de defesa (relacionados à detoxificação/xenobióticos, à defesa antioxidante e à resposta imunológica);

2 - Anotar a arquitetura da região codificadora (CDS) de genes selecionados da lista acima;

3 - Definir um gene de referência adequado para análises de expressão gênica;

4 - Avaliar os perfis de expressão dos genes selecionados em amostras de operárias de *F. varia* em diferentes momentos do desenvolvimento adulto;

5 - Analisar a expressão diferencial dos genes listados em dados de RNA-seq do tegumento de operárias de *F. varia* recém emergidas e forrageiras.



## **2. Material e Métodos**



## MATERIAL E MÉTODOS

---

**Nota:** O presente trabalho é parte de um projeto maior, envolvendo um consórcio de Universidades e pesquisadores brasileiros. O consórcio sequenciou e analisou o genoma de um indivíduo macho da abelha *Frieseomelitta varia*, apoiado pelo Projeto Universal CNPq (processo no. 454103/2014-0). Os dados gerados permitiram a montagem (ainda incompleta) do genoma (organizado em longas sequências chamadas *scaffolds*) e a predição de modelos gênicos. O tamanho do genoma de *F. varia* (versão 1.1) está estimado em ~275 Mb (275.421.029 pb), distribuídos em 2.173 *scaffolds*, com previsão de 11.115 genes codificadores de proteínas (dos quais, cerca de 8.200 ortólogos detectados no genoma de *A. mellifera*). Estas informações estão disponíveis numa base de dados, não-pública, da qual tivemos acesso durante o desenvolvimento deste Mestrado.

### 2.1 Identificação de diferentes categorias de genes no genoma de *Frieseomelitta varia*

O primeiro passo foi identificar genes envolvidos com mecanismos gerais de defesa da abelha *F. varia*. Para isso, nós elencamos algumas categorias: (i) genes relacionados a detoxificação/xenobióticos, genes codificadores (ii) de enzimas de defesa antioxidante e (iii) de proteínas de resposta imunológica. Para a elaboração de uma lista de genes, com foco em Hymenoptera, a literatura científica foi consultada, por meio buscas no PubMed (NCBI) usando as seguintes palavras-chave: “antioxidant”, “xenobiotic”, “detoxification”, “immune”, “*Apis mellifera*”, “bee”, “*Nasonia vitripennis*”. As sequências (em formato FASTA) de cada gene foram recuperadas no GenBank (NCBI) e serviram de entrada para alinhamentos contra os *scaffolds* do genoma e genes preditos de *F. varia*, que se encontram hospedados no LBDA BLAST Server (<http://143.107.143.160:8080/>, com acesso restrito a usuários cadastrados), usando ferramenta BLAST (Altschul et al. 1990). Além disso, o mesmo raciocínio de busca, descrito acima, foi utilizado para identificar: (i) potenciais genes de referência (aqueles cuja abundância de transcritos é estável entre fases do desenvolvimento e/ou tecidos e/ou amostras

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

sob análise) e (ii) genes relacionados à progressão do desenvolvimento adulto. Foram usadas palavras-chave tais como: “reference genes”, “housekeeping genes”, “longevity”, “aging”, “behavior”.

### **2.2 Anotação da estrutura gênica e desenho de oligonucleotídeos específicos**

Alguns dos genes identificados no item 2.1 foram selecionados, tanto para anotação da estrutura de suas respectivas regiões codificadoras (ou CDS, do inglês *coding sequence* – região que abrange do códon ATG, codificador de do aminoácido metionina, ao códon de parada da tradução, TAA, TAG ou TGA) quanto para análises de expressão gênica. Nesta direção, as suas respectivas sequências em formato FASTA foram manualmente anotadas no programa Artemis (Rutherford et al., 2000). A anotação das estruturas gênicas facilitou o desenho manual de pares de oligonucleotídeos específicos (que daqui em diante serão chamados de *primers*). Os *primers* foram desenhados contendo, preferencialmente, 20 nucleotídeos, conteúdo G+C de ~50%, e flanqueando pelo menos dois exons distintos (o que permite diferenciar produtos de PCR (amplicons) produzidos a partir DNA genômico e de cDNA). O programa GeneIdea (Freire & Fernandes 2018) foi utilizado para gerar as imagens das estruturas (exons/íntrons) dos genes. A Tabela 1 resume as informações destes genes e seus respectivos pares de *primers*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1: Lista de cada gene estudado, seu GENEID e os primers Forward e Reverse.

Símbolo do Gene	Anotação	Identificador (FvarID)	Primer (5' -> 3')	Tamanho do Amplicon (pb)	
				gDNA	cDNA
<i>tbpa</i>	TATA-Binding Protein-Associated Factor 172	Fvar10278	F: TGCTGGACAACCACTTTCTG	306	142
			R: GTGCGGCTAATGAAACCAAT		
<i>ef1a</i>	Elongation Factor 1A	Fvar03548	F: GACTGTCTGAACGCAAGGAAG	372	175
			R: TCAACACACCGGTTTCAACA		
<i>rpl32</i>	Ribosomal Protein L32	Fvar00764	F: TTTGATGCCGAATATTGGTT	322	149
			R: ACTCCGTGAGCAATCTCAGC		
<i>cyp6aql</i>	Cytochrome P450 6AQ1	Fvar06382	F: TAGGCAGCCACTACAATCCG	1.669	297
			R: CGGTGGTGGCTTTTCGAATG		
<i>cyp shade</i>	Cytochrome P450 314 A1 (Shade)	Fvar04549	F: TATCGCTCGCATTTTGGACG	486	326
			R: TCGGCGCGAGGATAAATTCA		
<i>cyp spook</i>	Cytochrome P450 307A1 (Spook)	Fvar00240	F: GCCGGGAATTTTCGTTGGATT	1.198	319
			R: TGCACGAGTTTGTAGCCCAT		
<i>hsp90</i>	Heat Shock Protein 90	Fvar01077	F: CAAAGTCAGGAACAGCTGAG	466	372
			R: TCTTCGTCTACCTGAACGAC		

## MATERIAL E MÉTODOS

<i>jhe</i>	Juvenile Hormone Esterase	Fvar09678	F: TGGGATCTTATTGCACCTCA	384	313
			R: GCATCATCTGCATGGCTCAC		
<i>vg</i>	Vitellogenin	Fvar10799	F: CGGCATCACTGGGAACTCTT	622	282
			R: AACGTAGACCAGATTGCCGG		
<i>gst-s1</i>	Glutathione S-Transferase S1	Fvar13088	F: GGGTACTTCGTCAACGGAAA	644	143
			R: GGCAGCGATCTGACTTTCTC		
<i>gst-s4</i>	Glutathione S-Transferase S4	Fvar07860	F: CGGCTTTGAAAGCCAAGAAG	336	265
			R: TGGTCTTTTTTCTATCCAGC		
<i>rel</i>	Relish	Fvar03195	F: TGTCTTATGGTCGAACTGCA	525	317
			R: ATGTCCAATCGCTCCTTCT		
<i>dl</i>	Dorsal	Fvar11817	F: TGCCACTGTCACCGATTGTA	646	472
			R: AGTAATGCTGATTCAGTGGC		
<i>sod2</i>	Superoxide Dismutase 2	Fvar07326	F: AAGCTGTTGCCAAAGGTGAT	236	141
			R: TTGAGAAGTGCGACATCTGG		
<i>cat2</i>	Catalase 2	Fvar01451	F: TCCATTGGAAAACGAACTCC	2877	158
			R: AAAGAAAATGGGCGTGTTGT		

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3 Material biológico

O material biológico foi coletado no Meliponário da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto, por gentil concessão do Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares. Não identificamos na literatura nenhum trabalho que classifique o desenvolvimento de *F. varia*, em especial, as diferentes fases das operárias adultas. Por outro lado, sabe-se que a diferenciação de idade de operárias adultas pode ser avaliada examinando-se a pigmentação da cutícula, com uma escala de claro a escuro à medida que a idade progride (Boleli et al. 1999, Dallacqua 2005). Com base nestas informações e na experiência que adquirimos ao longo deste estudo, propomos um critério de classificação de operárias (Figura 1) em três momentos da vida adulta.



#### **Nova (N)**

Recém-emergida ou poucos dias de vida adulta

Corpo despigmentado ou levemente pigmentado

Não voa em resposta a estímulo

#### **Intermediária (I)**

Semelhante a nutridora, coletada próximo a células de cria, abdômen maior

Corpo medianamente pigmentado, com tórax bem pigmentado

Tentativa (frustrada) de voo em resposta a estímulo

#### **Forrageira (F)**

Coletada ao retornar para a colônia, abdômen menor

Corpo totalmente pigmentado

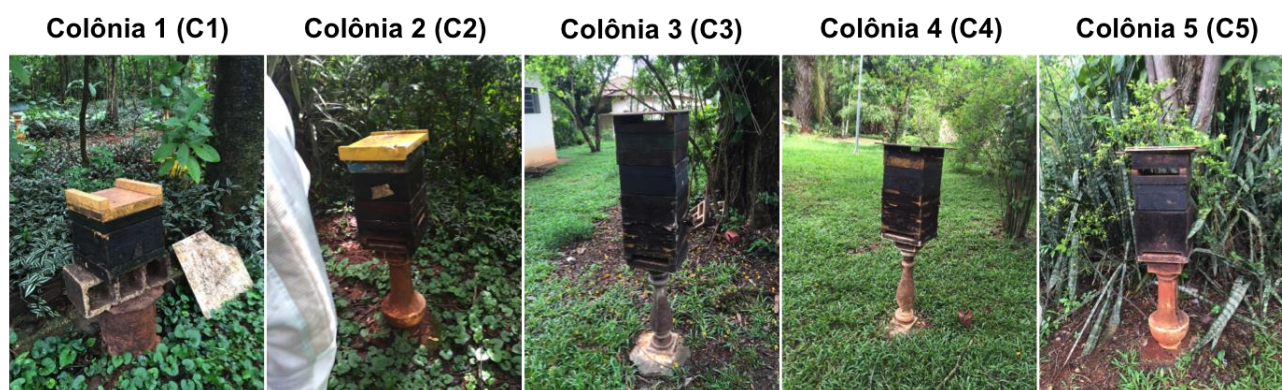
Voa, independente de resposta a estímulo

*Figura 1: Operárias adultas da abelha F. varia em diferentes fases ao longo do tempo e características utilizadas para coleta. Imagens: Francis M. F. Nunes.*

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 5 operárias de cada grupo etário (N=nova, I=intermediária e F=forageira) foram coletadas de cinco colônias distintas (Figura 2). Cada conjunto de 5 indivíduos de um mesmo grupo etário e mesma colônia constituíram uma *pool*, somando 15 amostras biológicas, sendo cinco amostras biologicamente independentes por idade (N=5 amostras, I=5 amostras, F=5 amostras). Avaliou-se a presença de corbícula e unha não bifurcada nos últimos pares de pernas dos indivíduos coletados, para garantir que se tratavam de operárias. Machos e rainhas não possuem corbícula e tais unhas nos machos são bifurcadas.

Figura 2: Colônias de *F. varia* localizadas no Meliponário da Universidade de São Paulo (USP),



campus de Ribeirão Preto, utilizadas para coleta de material biológico. Da esquerda para a direita, colônia 1 a 5, respectivamente. Imagens: Francis M. F. Nunes.

A fim de se obter mais informações, foram consultados dois resumos publicados nos anais de um evento científico e, também, dados da monografia de Rita de Cássia Bulgarelli Cardoso, orientada pelo Dr. Sidnei Matheus (FFCLRP-USP), que analisaram a divisão etária de trabalho em operárias de *F. varia* (Cardoso, 2010). Faustino et al. (2002) observaram operárias de *F. varia* vivendo por até 55 dias, Figueiredo et al. (2002) por até 61 dias e Cardoso (2010) por até 82 dias. Além disso, imagens das amostras coletadas para o presente estudo também foram analisadas pelo Dr. Sidnei. Portanto, com base no desenvolvimento temporal de comportamentos encontrados em Cardoso (2010) e comunicação pessoal do Dr. Sidnei, podemos adicionar as seguintes informações:

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

**Operária Nova (N):** possuem de 0 a 5 dias de vida adulta, fazem limpeza corporal (*grooming*) e pedem alimento (trofalaxia), e a partir do quarto dia que começam a trabalhar com cerúmen.

**Operária Intermediária (I):** possuem de 12 a 19 dias de vida adulta, quando participam do provisãoamento das células de cria (regurgitando alimento nas mesmas), e também não executaram nenhuma atividade fora da colônia.

**Operária forrageira (F):** de 29 a 50 dias (salientando que as coletas de pólen costumam ser realizadas por forrageiras com idades mais avançadas).

As operárias coletadas foram colocadas individualmente em tubos esterilizados (livres de RNase e DNase) de 1,5 mL com 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) e mantidas a -80°C até o início da extração de RNA total.

### **2.4 Avaliação de Expressão Gênica**

#### **2.4.1 Extração de RNA Total**

As amostras em Trizol® foram descongeladas a temperatura ambiente e em seguida maceradas com o uso de pistilos plásticos (estéreis). Os tubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para lise de membranas e dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) gelado (4°C). Os tubos foram agitados manualmente por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e, posteriormente, foram centrifugados a 12.000 x g a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 1,5 mL e acrescidos de 500 µL de isopropanol (Merck) a temperatura ambiente. Após 10 segundos em vórtex, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e os tubos centrifugados a 12.000 x g a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os produtos precipitados (*pellets*) foram lavados com 1 mL de etanol 75% (Merck) gelado (4°C). Os tubos foram então centrifugados a 12.000 x g, a

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e o etanol residual foi evaporado a temperatura ambiente. Os *pellets* foram ressuspensos em volumes de 50 µL a 120 µL de água ultrapura (tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v) (Sigma) autoclavada, de forma que todos fossem completamente desfeitos. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorvância óptica em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). As amostras foram estocadas a -80°C até o preparo do cDNA.

### **2.4.2 Síntese de cDNA**

Volumes de RNA total, com massas correspondentes a 4 µg, foram completados com água ultrapura para 8 µL. Para remoção de possível contaminação por resíduos de DNA, foram adicionados 0,5 µL *10x DNase I Reaction Buffer* (Invitrogen) e 0,5 µL de *DNase I* (Invitrogen), incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM, Invitrogen) com posterior incubação em termociclador em *Eppendorf Mastercycler gradient* a 65°C por 10 minutos, para inativação da enzima. O RNA total tratado com DNase foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA, em volume final de 20 µL, utilizando-se, por amostra, o seguinte protocolo: 1 µL de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 ng/mL), 1µL de uma mistura de dNTPs (10 mM), com incubação em termociclador a 65°C por 5 minutos; 4 µL de tampão *5x First Strand Buffer* (Invitrogen), 2µL de ditriotretitol 0,1M (DDT, Invitrogen), 1 µL de inibidor de RNase (*RNase OUT<sup>TM</sup>*, 40 U/µL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 2 minutos; 0,5 µL de água ultrapura e 0,5 µL da enzima *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (200 U/mL, Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos, com posterior ciclo de inativação da enzima a 70°C por 15 minutos. Como controles, foram preparadas reações sem a adição da enzima *SuperScript<sup>TM</sup> II* (C1, controle 1) ou sem a adição de RNA molde (C2, controle 2).



### 2.4.3 Extração de DNA genômica (gDNA)

Para checar a montagem dos modelos gênicos selecionados e ao mesmo tempo validar os pares de *primers*, foram planejadas PCR usando gDNA como molde. Para isso, foi coletado um único macho, na fase de pupa de olho branco, também oriundo do Meliponário da USP Ribeirão Preto. O abdômen foi retirado e o restante do corpo foi utilizado para extração de gDNA, utilizado o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e as recomendações do fabricante. O rendimento da extração de DNA foi de 11,3 µg de DNA. Foi preparada uma solução de trabalho a 100 ng/µL.

### 2.4.4 PCR semiquantitativa e análise estatística

Para a validação dos pares de *primers* foi preparado um *pool* de cDNA de todas as amostras, e realizadas reações (PCR convencional, vide reagentes e *mix* abaixo) em gradiente de temperatura, com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial das fitas a 95°C por 3 minutos, seguido de 28-40 ciclos de: 95°C por 30 segundos, X°C (gradiente, com X = 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 e 61°C) por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Dependendo do gene, utilizou-se ou o *pool* de cDNA concentrado ou o diluído 10X (1:10). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1% (vide abaixo). A Tabela 2 resume as temperaturas ótimas encontradas para o anelamento dos *primers* para cada gene. De posse destas informações, foram então preparadas as PCRs para cada amostra (grupos N (n=5), I (n=5), F (n=5), gDNA (n=1)), incluindo os controles C1, C2 e um controle negativo (CN ou “branco”) sem adição de cDNA ou gDNA. Para cada reação foram utilizados: 10 µL de Master Mix (Cellco), 7 µL de água ultrapura, 2 µL de uma solução combinada de *primers* (1 µL de *forward*, 1 µL de *reverse*, 10 pmoles/µL cada *primer*) e 1 µL de molde de cDNA, num volume total de 20 µL por tubo. As reações para cada gene foram colocadas no termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial das fitas a 95°C por 3 minuto, seguido de “N” ciclos

## MATERIAL E MÉTODOS

(vide Tabela 2) de: 95°C por 30 segundos, X°C (vide Tabela 2) por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR de cada gene foram aplicados em gel de agarose 1% (Amersham-Pharmacia Biotech) em tampão 1X TBE (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0), corado com *UniSafe Dye*® (20,000X - Uniscience). O tempo de corrida (eletroforese) foi de 2 horas a 100 volts. O tamanho dos fragmentos amplificados foram comparados com a migração do marcador (aplicação de 5 µL) de peso molecular de 100 pb (*100 bp DNA Ladder*, 0,5 µg/µL, Invitrogen). Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com auxílio do aparelho *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad). A densidade óptica das bandas geradas (quantificação de *pixels*) foi mensurada com auxílio do programa *Image Lab™* (versão 4.1, Bio-Rad), usando o parâmetro “*adjusted intensity*”, que subtrai os *pixels* do *background* da contagem de *pixels* para cada banda. Para normalizar os valores correspondentes à abundância de transcritos de cada amostra por gene, utilizou-se a razão (*ratio*), onde os denominadores foram os respectivos valores de expressão do gene *tbpa*. Os dados foram analisados por teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk W,  $p > 0,05$ ) e os dados apresentaram distribuição normal. Desta forma, os seguintes testes paramétricos foram utilizados para as análises estatísticas entre os grupos N (n=5), I (n=5) e F (n=5): ANOVA um critério seguido do teste de Neuman-Keuls (StatPlus®:mac2009, AnalystSoft), considerando  $p < 0,05$ .

*Tabela 2: Condições usadas nas PCRs para a amplificação dos genes estudados - temperatura de anelamento dos primers, número de ciclos e concentração de cDNA (concentrado = 200 ng/µL e diluído 10X = 20 ng/µL).*

Nome do Gene (símbolo)	Temperatura de Anelamento dos <i>Primers</i>	Número de Ciclos	cDNA
TATA-Binding Protein-Associated Factor 172 ( <i>tbpa</i> )	60°C	32	Diluído
Elongation Factor 1a ( <i>ef1a</i> )	60°C	32	Diluído

## MATERIAL E MÉTODOS

Ribosomal Protein L32 ( <i>rpl32</i> )	56°C	38	Diluído
Cytochrome P450 6AQ1 ( <i>cyp6aq1</i> )	60°C	28	Diluído
Cytochrome P450 314 A1 Shade ( <i>cyp shade</i> )	60°C	40	Diluído
Cytochrome P450 307A1 Spook ( <i>cyp spook</i> )	60°C	40	Concentrado
Heat Shock Protein 90 ( <i>hsp90</i> )	60°C	40	Diluído
Juvenile Hormone Esterase ( <i>jhe</i> )	60°C	30	Diluído
Vitellogenin ( <i>vg</i> )	60°C	40	Concentrado
Glutathione S-Transferase S1 ( <i>gst-s1</i> )	60°C	40	Diluído
Glutathione S-Transferase S4 ( <i>gst-s4</i> )	56°C	35	Concentrado
Relish ( <i>rel</i> )	56°C	35	Concentrado
Dorsal ( <i>dl</i> )	60°C	40	Concentrado
Superoxide Dismutase 2 ( <i>sod2</i> )	56°C	35	Concentrado
Catalase 2 ( <i>cat2</i> )	56°C	35	Concentrado

### 2.4.5 Análise de RNA-seq de tegumento de operárias adultas

Os dados de RNA-seq utilizados no presente trabalho foram gerados durante a doutorado do Dr. Tiago Fálcon Lopes, desenvolvido no Programa de Pós-graduação em Genética (FMRP-USP) sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi (FFCLRP-USP). Os autores investigaram a maturação cuticular em abelhas sociais e solitárias, onde uma das abordagens foi comparar transcriptomas de tegumentos de operárias em três fases do desenvolvimento (pupa-farata medianamente pigmentada [Pbm], adulta recém-emergida [RE] e forrageira [Fg]), incluindo amostras de *F. varia*. Para o RNA-seq de tegumentos de *F. varia*, foram preparadas três amostras biológicas independentes para cada fase do desenvolvimento, cada uma constituída de um *pool* de cinco tegumentos abdominais. Durante este doutorado, o genoma de *F. varia* ainda não havia sido sequenciado e, portanto, os autores

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

fizeram montagens *de novo* dos transcriptomas, e buscaram ortólogos em *Apis mellifera*. Considerando o escopo do presente estudo, solicitamos os dados aos autores, os quais foram prontamente e gentilmente cedidos. Para o presente estudo foram usados apenas os dados de RE e Fg, em busca de se compreender a progressão do estágio imaginal (tanto o desenvolvimento quanto o envelhecimento de adultos) e seus mecanismos gerais de defesa. Estas novas análises de bioinformática foram realizadas pelo Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro (FCAV-UNESP). Os dados foram alinhados diretamente ao genoma de *F. varia* (e seus respectivos modelos gênicos preditos) utilizando-se o pacote Tuxedo (Trapnell et al. 2012). No entanto, foi usado o alinhador HiSat2 (Kim et al. 2015) ao invés de TopHat. As reads não mapeadas num primeiro *round* passaram por trimagem de adaptadores 3' e 5', além de extremidades (regiões de baixa qualidade ou poli adeniladas). Após estas etapas, um novo round de alinhamento foi realizado e os conjuntos de dados foram combinados. A partir deste ponto, segue o protocolo Tuxedo normalmente (*cufflinks*, *cuffmerge*, *cuffdiff*). O *cuffdiff* normaliza e estimar a variância, gerando os valores de expressão de acordo com a métrica FPKM (*fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*), além de fornecer o log<sub>2</sub>-fold-change e a significância estatística. Após as análises, os dados foram filtrados com base em uma lista de 143 genes (ANEXO 1) envolvidos nos processos biológicos de interesse do presente estudo (desenvolvimento, envelhecimento e defesa). Alguns destes genes listados que apresentaram expressão diferencial serão apresentados na seção Resultados e Discussão.



# **3. Resultados e Discussão**

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Levantamento de literatura e genes candidatos

Como primeiro resultado, buscamos por artigos científicos em Hymenoptera (com foco maior em *A. mellifera*) sobre mecanismos gerais de defesa, genes relacionados à progressão do desenvolvimento adulto (envelhecimento e comportamento) e genes de referência. Dos trabalhos identificados, priorizamos as listas de genes descritas por alguns autores: Claudianos et al. (2006), Corona & Robinson (2006), Evans et al. (2006), Wheeler et al. (2006), Oakeshott et al. (2010) e Ament et al. (2012). Em seguida, por meio de buscas de bioinformática (BLAST), identificamos no genoma da abelha *F. varia* os ortólogos de 143 genes de himenópteros relativos às famílias GST, CCE, P450, à imunidade, à defesa antioxidante, à resposta a estresse e ao desenvolvimento. Damos uma menor ênfase aos genes do sistema imunológico, visto que um trabalho nesta direção está sendo desenvolvido pela Profa. Dra. Anete Pedro Lourenço (UFVJM). A Tabela 3 resume os achados (vide também ANEXO 1). Com base no que foi descrito na Introdução, asseguramos que estes genes e processos biológicos estejam intimamente relacionados entre si, o que justifica nossa decisão de abordá-los em conjunto no presente estudo.

Tabela 3: Síntese de informações sobre 143 genes de interesse do presente estudado.

Família / Processo Biológico	Quantidade de Genes	Principais Funções
GST	13	Proteção contra xenobióticos e danos oxidativos
CCE	24	Degradação de xenobióticos e desenvolvimento neural
P450	39	Detoxificação e biossíntese de ecdisteroides
Antioxidante	26	Proteção contra radicais livres
Desenvolvimento*	27	Longevidade/Envelhecimento e Comportamento
Resposta Imune / Estresse	14	Cascatas de defesa

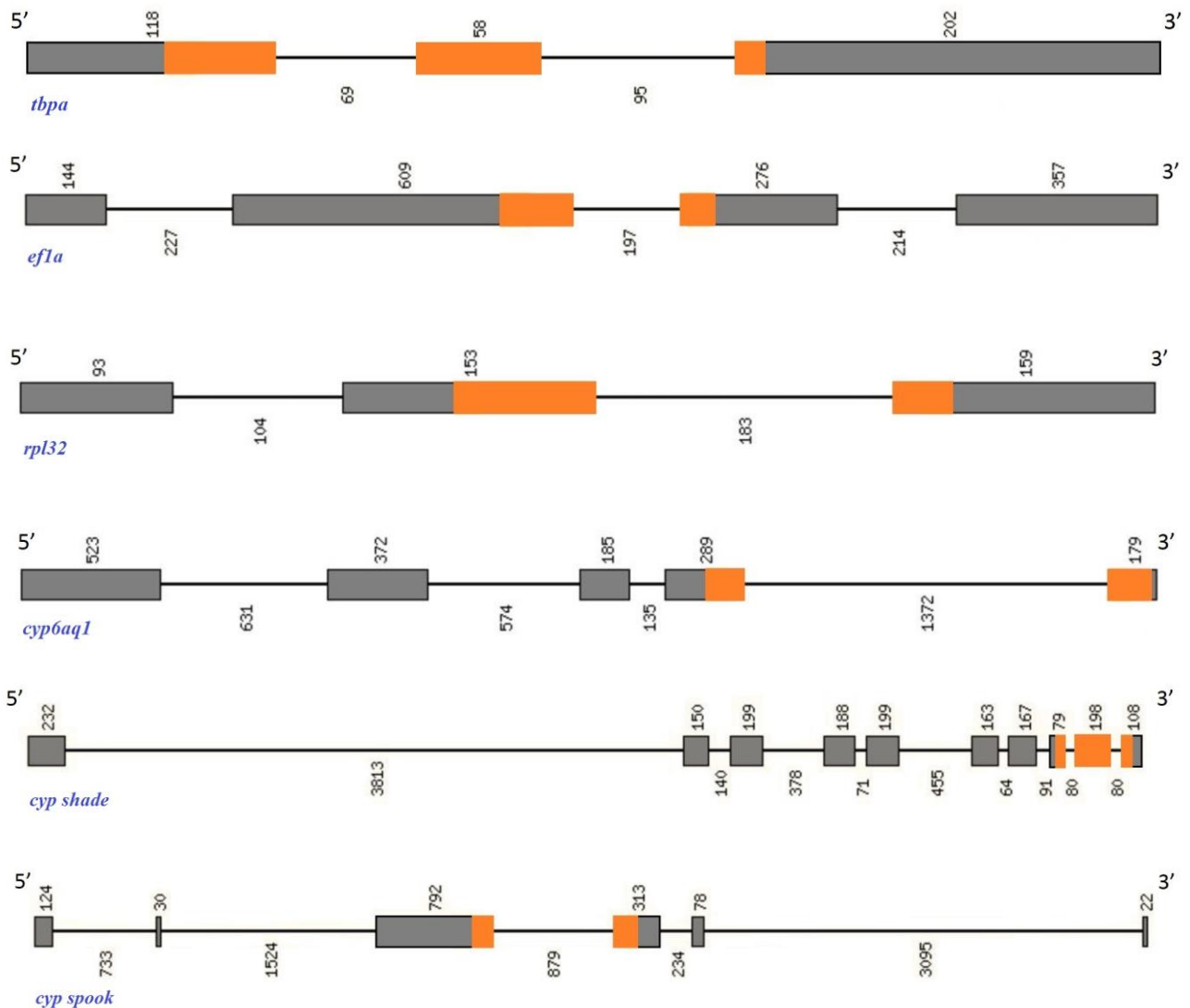
\*fase adulta

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2 Anotação dos genes analisados por densitometria

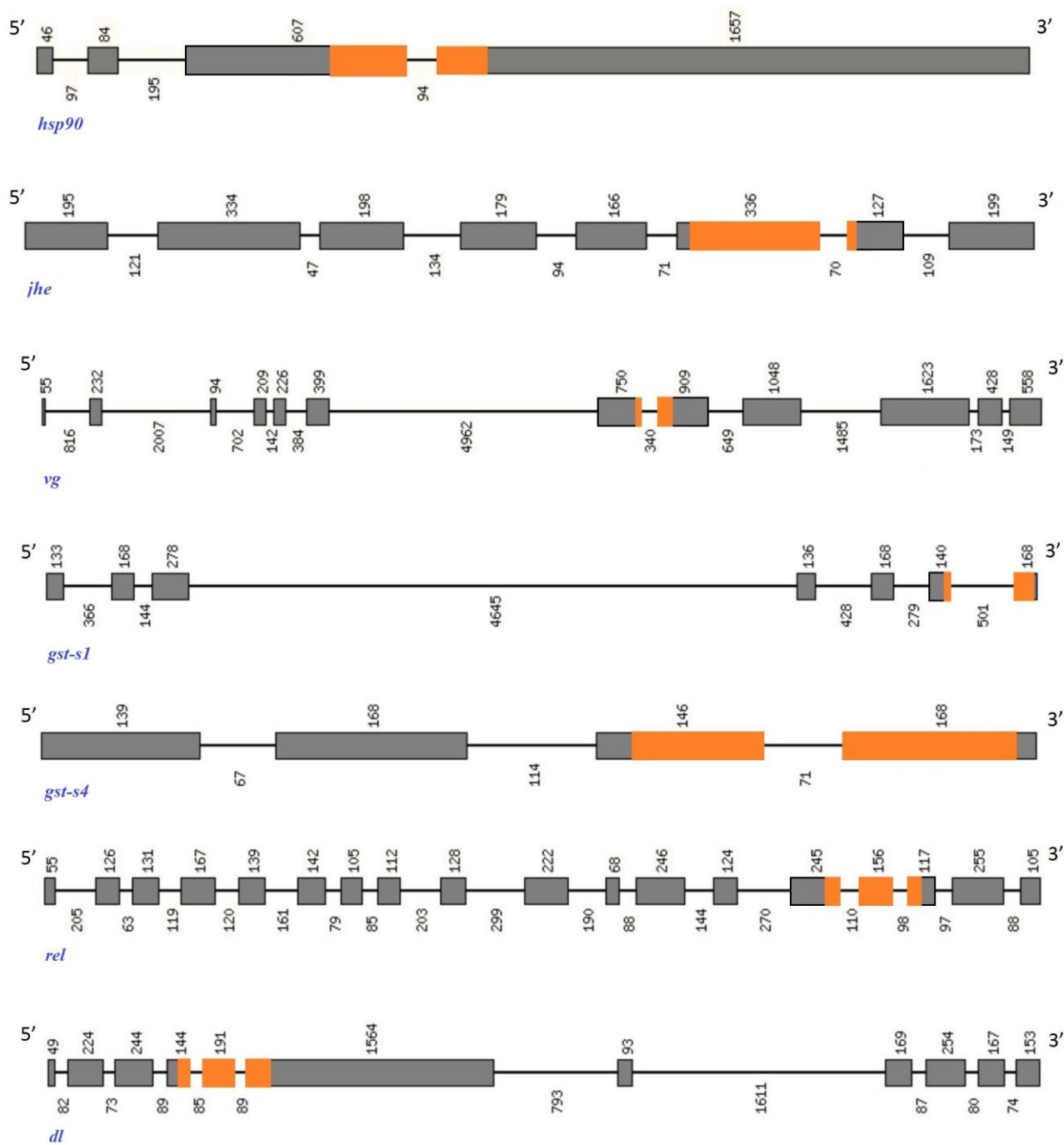
Para avançar neste estudo, selecionados 15 genes, os quais anotamos a arquitetura das suas CDS (regiões codificadoras) e desenhamos *primers* para validar cada modelo gênico por meio da amplificação de fragmentos a partir de gDNA e cDNA, bem como para analisar a expressão gênica.

A Figura 3 apresenta tais arquiteturas e as regiões de amplificação para cada gene.



(Continua...)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



(Continua...)



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

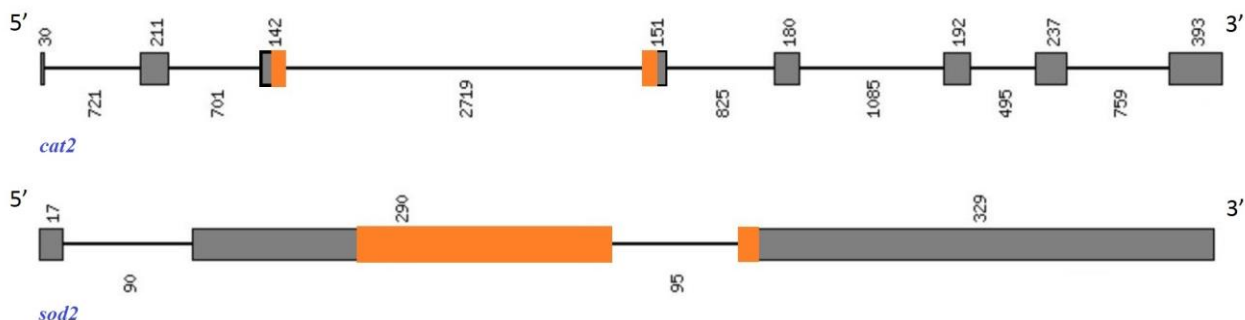


Figura 3: Estrutura dos 15 genes codificadores cujos níveis de expressão (mRNA) foram estudados por PCR e densitometria. Os retângulos representam os éxons e as linhas os íntrons. O tamanho dos éxons, em pares de base (pb), está representado acima de cada retângulo. O tamanho dos íntrons, e em pares de base (pb), está representado abaixo de cada linha. A cor laranja representa o amplicon de cada gene, com um primer localizado em cada extremidade do amplicon. O códon de iniciação (ATG) está localizado no começo da extremidade 5' e códon de terminação (TAA, TGA ou TAG) está localizado no último exon na extremidade 3'.

### 3.3 Validação de modelos gênicos

Para validar os modelos gênicos preditos, realizamos PCR usando gDNA e cDNA como moldes. A partir de cDNA, todos os genes amplificaram. No entanto, a partir de gDNA, apenas 8 dos 15 genes apresentaram amplificação (*tbpa*, *ef1a*, *rpl32*, *cyp shade*, *hsp90*, *jhe*, *vg*, *gst-s1*) nas condições testadas. Os amplicons de gDNA esperados para alguns genes são grandes e podem explicar o insucesso: *cyp 6aq1* (1.669 pb), *cyp spook* (1.198 pb) e *cat* (2.877 pb). Para os demais genes, com amplicons esperados entre 236 pb a 646 pb, assumimos que novos *rounds* de otimização serão necessários para obter sucesso. A Figura 4 exemplifica a amplificação de fragmentos de gDNA e cDNA para quatro dos oito genes, cujos tamanhos dos amplicons estão dentro do esperado (vide Tabela 1, Material e Métodos).

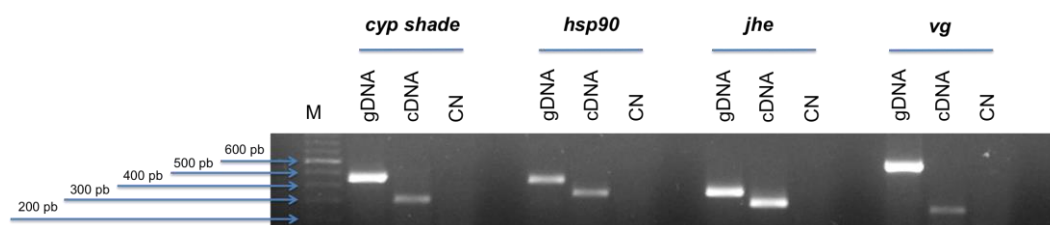


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo produtos de PCR (amplicons) gerados a partir de moldes de DNA genômico (gDNA) e DNA complementar (cDNA) para os genes *cyp shade*, *hsp90*, *jhe* e *vg* de *E. varia*. CN é o controle negativo (branco) sem adição de qualquer molde. M – marcador de peso molecular (100 pb).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.4 Análise de potenciais genes de referência

Uma vez validados todos os modelos gênicos usando cDNA e alguns usando gDNA, o passo seguinte foi buscar por genes com expressão estável para servir como referências, a fim de se normalizar os níveis de expressão dos demais genes. Para este fim, testamos três genes: *tbpa*, *ef1a* e *rpl32*. A escolha destes genes para teste se deve por serem usados como referências em outros trabalhos de insetos. Como pode ser observado nas Figuras 5 e 6, seus níveis são de fato estáveis e semelhantes, e as flutuações podem representar pequenas variações técnicas (na pipetagem, na síntese de cDNA, no preparo das PCRs etc.) ou mesmo biológicas.

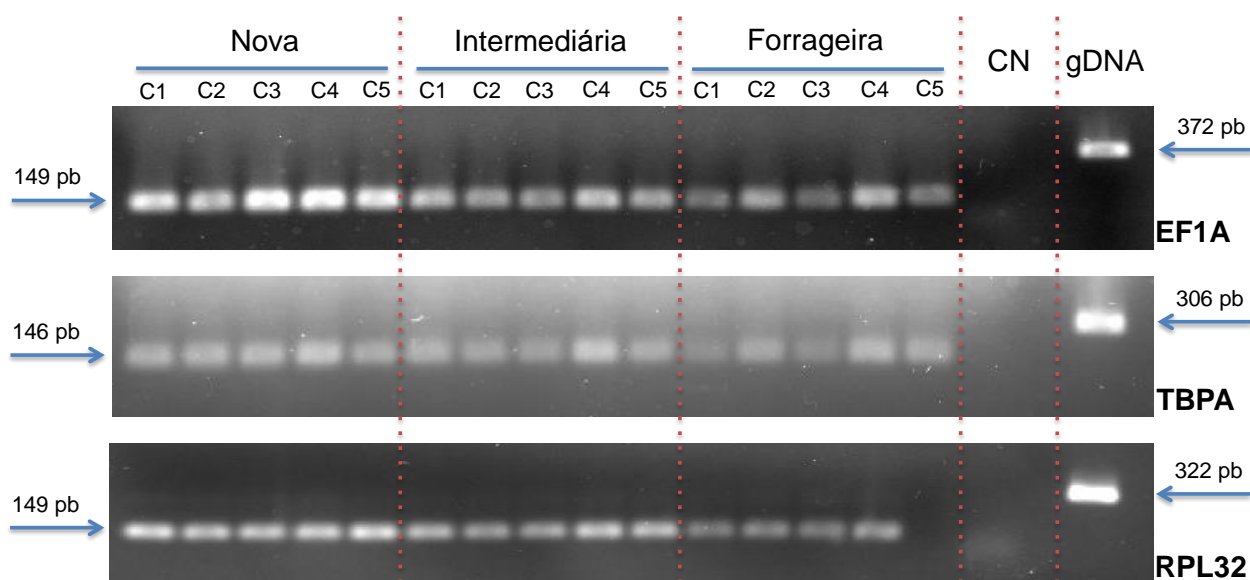


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1% contendo amplicons de PCR (gDNA) e de RT-PCR (cDNA) dos genes *ef1a*, *tbpa* e *rpl32* em amostras de operárias de *E. varia* novas (N), intermediárias (I) e forrageiras (F). CN é o controle negativo (branco) sem adição de qualquer molde. As setas à esquerda e à direita indicam, respectivamente, os tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) de cDNA e gDNA. C1 a C5 indicam amostras provenientes de colônias 1 a 5. Observação: a ausência de banda no poço “Forrageira C5” para o gene *rpl32* trata-se de uma falha consistente na amplificação dessa amostra.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

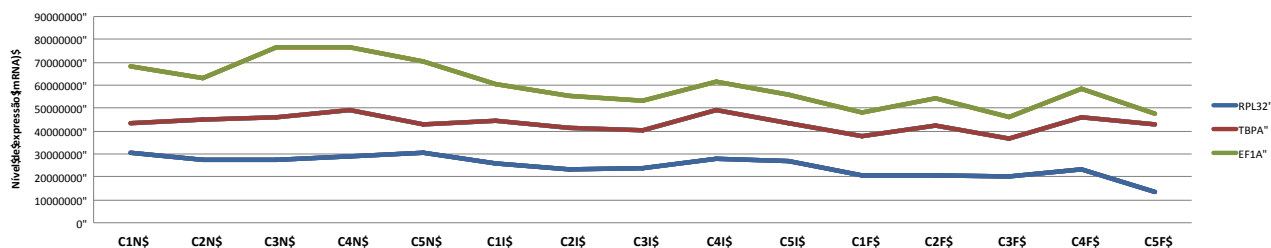


Figura 6: Perfil de expressão (por RT-PCR (cDNA)) dos genes *efl1a* (em verde), *tbpa* (em vermelho) e *rpl32* (em azul) em amostras de operárias de *F. varia* novas (N), intermediárias (I) e forrageiras (F). C1 a C5 indicam amostras provenientes de colônias 1 a 5. Os dados foram mensurados por densitometria ótica e os valores correspondem a unidades arbitrárias. A ausência de amplificação do gene *rpl32* na “Forrageira C5” culminou na quantificação de um valor próximo ao background do gel.

Como observado, a amostra C5F não amplificou para o gene *rpl32*, mesmo após repetições. Além disso, o gene *rpl32* apresentou variação estatisticamente significativa na análise de RNA-seq entre os transcriptomas de tegumentos de operárias recém-emergidas e forrageiras. Calculamos o coeficiente de variação dos dados de expressão, como indicativo de estabilidade. A expressão do gene *rpl32* apresentou o maior coeficiente: 0,397466, mostrando ser o mais variável dos três genes. O gene *efl1a* apresentou coeficiente de variação de 0,353649. O gene *tbpa* apresentou-se como o mais estável, com coeficiente de variação de 0,286677 e, portanto, foi selecionado como gene de referência no presente estudo.

### 3.5 Avaliação de expressão gênica

Dentre os Hymenoptera, organismos como a abelha *A. mellifera* são mais frequentemente usados em estudos genéticos, mas as suas características moleculares e comportamentais nem sempre podem ser generalizadas para outros grupos de insetos. Portanto, estudar *F. varia* é fundamental para entender a biologia molecular de abelhas nativas e explorar a capacidade destas como potenciais polinizadores para o uso comercial. Doze genes foram analisados por RT-PCR semiquantitativa com

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

relação à abundância de transcritos em diferentes momentos do desenvolvimento de abelhas operárias adultas da espécie *F. varia* (Figura 7). As reações de todos os controles (C1, C2 e CN) não apresentaram amplificação (dados não mostrados).

Genes individuais podem ser regulados up ou down e, numa perspectiva de desenvolvimento, a co-expressão de genes de uma mesma via indicam interação para a execução de um dado processo molecular. Portanto, a discussão dos resultados será feita de uma maneira que introduz dados das famílias de genes, destacando a importância geral dos genes dentro de uma via molecular, sejam estes de desenvolvimento, antioxidante, defesa, entre outras. Se quisermos especular sobre a capacidade de *F. varia* se tornar um polinizador mais amplamente utilizado, devemos primeiro entender a biologia molecular desse inseto e os níveis de expressão genética de genes chave. Como uma espécie pouco estudada no contexto genético, *F. varia* nos oferece a oportunidade de usar bancos de dados de genoma recém-sequenciados para avaliar a presença de genes específicos e seus níveis de expressão. Como mencionado na seção de metodologia, um total de 15 genes (incluindo as três potenciais genes de referência) foram avaliados em pools de amostras de abelhas inteiras. Além disso, e com o intuito de avançar sobre a compreensão da biologia de *F. varia*, exploramos também dados de transcriptoma do tegumento de operárias recém-emergidas e forrageiras. Nosso olhar foi sobre as potenciais diferenças de expressão dos 143 genes que listamos (ANEXO 1), em busca de elucidar as bases genéticas do desenvolvimento adulto deste tecido, e os aspectos associados à longevidade e aos mecanismos gerais de defesa. Destes 143 genes, um total de 74 são diferencialmente expressos entre os tegumentos de operárias recém emergidas e forrageiras, sendo 6 dos 24 CCEs, 18 dos 39 P450s, 3 dos 13 GSTs, 9 dos 26 antioxidantes, 13 dos 14 de resposta imune e, finalmente, 25 dos 27 de desenvolvimento (Tabela 5).

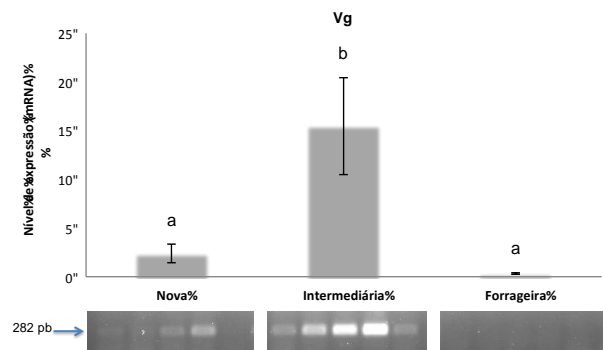
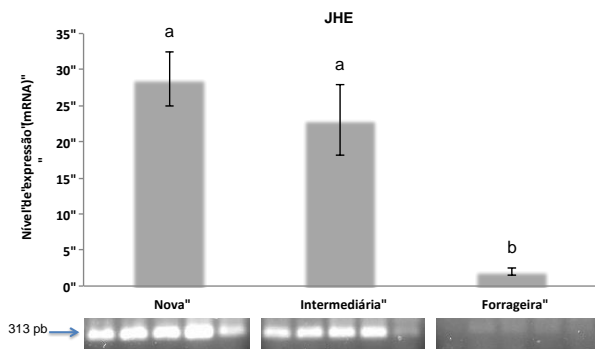
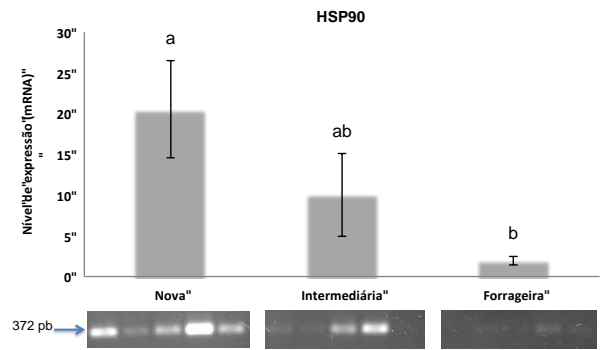
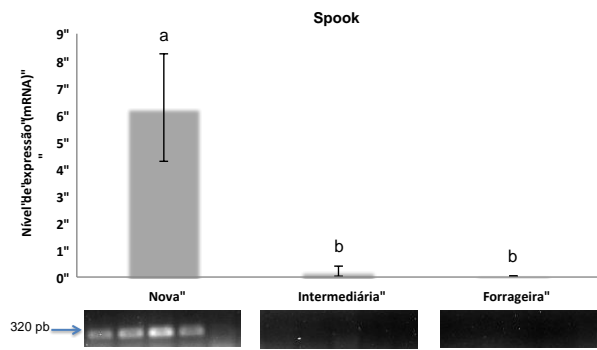
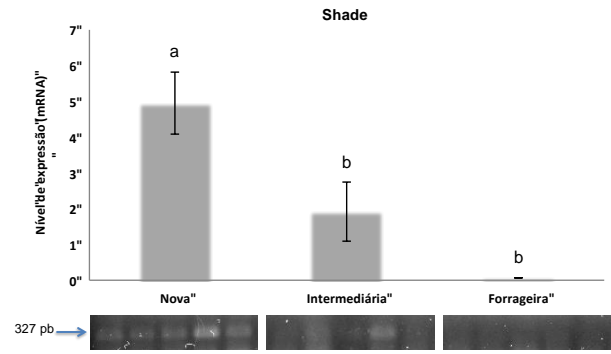
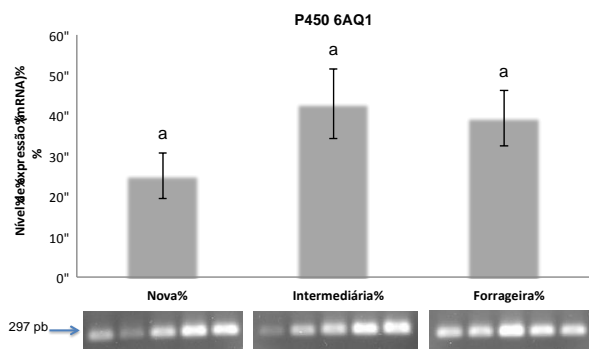
O uso de grandes quantidades de dados de expressão da tecnologia RNA-seq foi fundamental para a compreensão e caracterização de vias genéticas e cascatas em *F. varia*. Diferentemente da parte de densitometria deste estudo, os dados de RNA-seq foram compilados apenas a partir do tegumento

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

das abelhas coletadas. Com dados de expressão de dúzias de genes nas fases de vida recém-emergida e forrageira, foi possível afirmar a presença de vias moleculares conhecidas por serem ativas em espécies mais bem estudadas, como a abelha *A. mellifera* e mosca *D. melanogaster*. Além disso, os níveis de expressão de um determinado gene em um determinado estágio da vida podem ajudar a esclarecer sua função e seu efeito no comportamento das abelhas.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO



(Continua...)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

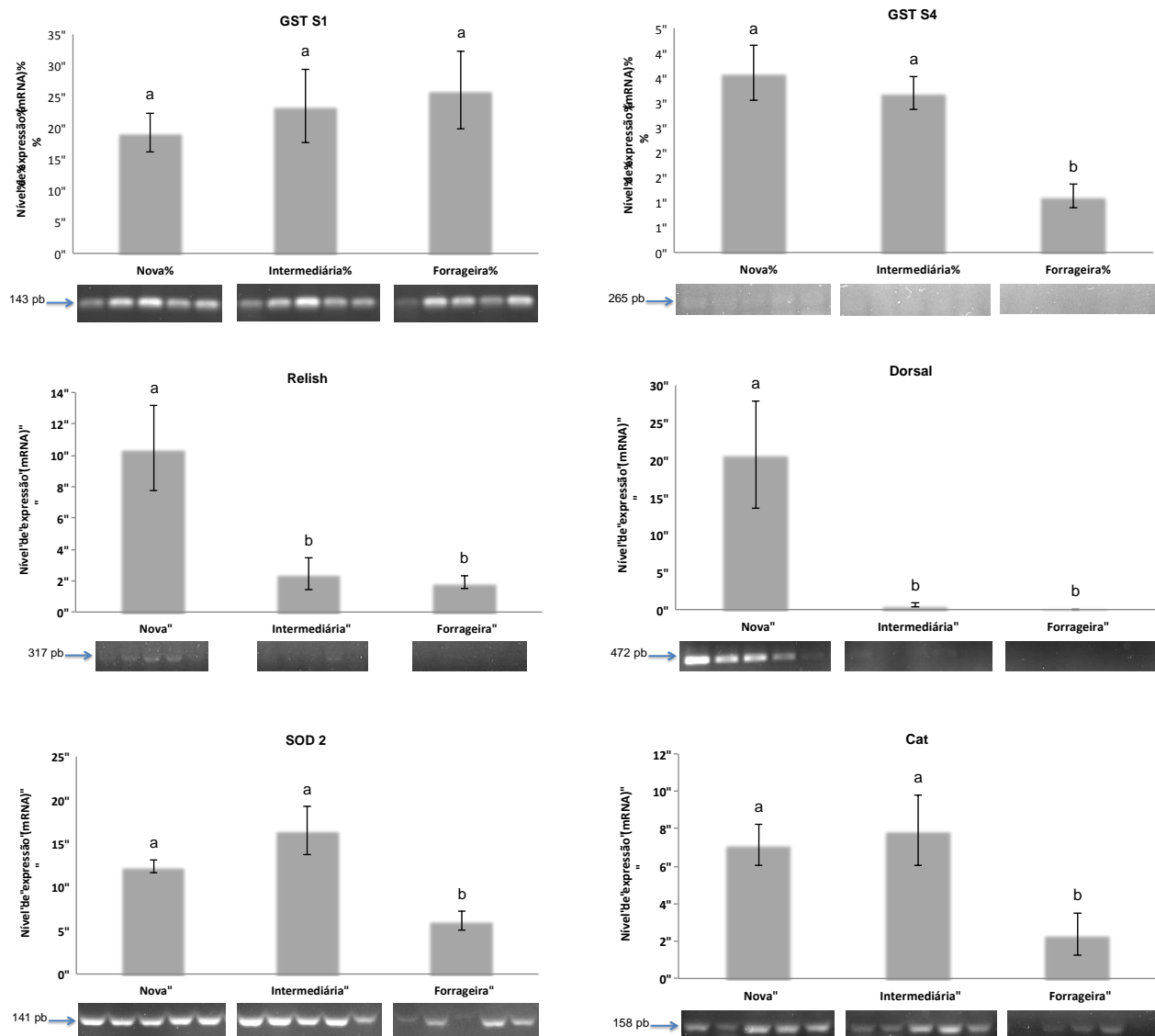


Figura 7: Expressão gênica (mRNA) semiquantitativa (RT-PCR) de doze genes selecionados neste estudo. Os níveis de expressão foram mensurados por densitometria ótica a partir dos volumes ajustados de pixels de cada banda (amplicon) observada por eletroforese em gel de agarose 1%, e normalizados pela expressão do gene *tbpa* para cada amostras de operárias de *E. varia* - novas (N, n=5), intermediárias (I, n=5) e forrageiras (F, n=5). Nas barras azuis estão representadas as média de expressão de cada gene em cada grupo e o erro padrão. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas pela análise One-Way ANOVA e Tukey Post-Hoc test ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4: Categorias de genes estatística ( $q\text{-value} < 0,05$ ) e diferencialmente expressos entre os transcriptoma de tegumentos de operárias recém-emergidas (RE) e forrageiras (Fg) de *F. varia*, analisados por RNA-seq. As contagens estão em normalizadas FPKM e níveis de expressão relativos estão expressos pelo Log 2 do Fold-Change (Log2 FC). Vermelho indica genes mais expressos (up regulados, Log2 FC positivo) em RE em comparação a Fg, enquanto verde indica genes menos expressos (down regulados, Log2 FC negativo) em RE em comparação a Fg.

Categoria	Fvar GeneID	Nome do gene	Recém-emergida	Forrageira	Log2 FC
CCE	Fvar09678-1.2	juvenile hormone esterase (jhe)	608,648	258,045	1,24
	Fvar12278-1.2	esterase FE4-like	1571,24	129,783	3,60
	Fvar12039-1.2	esterase E4-like	5,17204	152,165	-4,88
	Fvar03302-1.2	carboxylesterase	14,333	40,5984	-1,50
	Fvar00690-1.2	venom carboxylesterase-6 x1	20,0708	99,3364	-2,31
	Fvar08305-1.2	carboxylesterase clade I	26,5021	98,6517	-1,90
P450	Fvar07457-1.2	cytochrome P450 18a1	1,65019	0,459795	1,84
	Fvar10751-1.2	probable cytochrome P450 305a1	20,2576	0,674027	4,91
	Fvar04502-1.2	cytochrome P450 306a1 x1	2,1061	0,693344	1,60
	Fvar11633-1.2	probable cytochrome P450 301a1, mitochondrial	22,2132	3,17061	2,81
	Fvar11636-1.2	probable cytochrome P450 301a1, mitochondrial	20,8047	9,50202	1,13
	Fvar11158-1.2	6AS12 / probable cytochrome P450 6a13	183,806	20,2042	3,19
	Fvar08135-1.2	probable cytochrome P450 6a17	85,012	161,726	-0,93
	Fvar11174-1.2	6AR1 / probable cytochrome P450 6a14	406,234	3427,26	-3,08
	Fvar05229-1.2	6AS5 / cytochrome P450 6A1 x1	240,41	1088,43	-2,18
	Fvar03553-1.2	probable cytochrome P450 6a13	36,0945	132,822	-1,88
	Fvar06199-1.2	6BD1 / cytochrome P450 6k1	272,73	576,114	-1,08
	Fvar05458-1.2	cytochrome P450 6k1 x1	1,27181	2,94825	-1,21
	Fvar11836-1.2	9Q1 / cytochrome P450 9e2	116,241	174,564	-0,59
	Fvar12665-1.2	cytochrome P450 9e2	4,50198	26,8998	-2,58
	Fvar02593-1.2	cytochrome P450 9e2	116,415	262,956	-1,18
	Fvar02069-1.2	cytochrome P450 4C1	6,89578	153,312	-4,47
	Fvar09236-1.2	cytochrome P450 302a1, mitochondrial	27,6427	43,0911	-0,64
	Fvar01695-1.2	cytochrome P450 315a1, mitochondrial	5,31927	83,0464	-3,96
GST	Fvar11895-1.2	glutathione S-transferase D1	38,6942	2,49904	3,95
	Fvar06400-1.2	glutathione S-transferase 1	603,295	147,736	2,03
	Fvar07860-1.2	glutathione S-transferase S4	68,8492	132,381	-0,94
Antioxidante	Fvar07326-1.2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	775,032	388,064	1,00
	Fvar02659-1.2	thioredoxin peroxidase 3	428,94	247,871	0,79
	Fvar02671-1.2	HPX6	351,164	30,8857	3,51
	Fvar07326-1.2	MnSOD1 / superoxide dismutase [Fe]-like	775,032	388,064	1,00
	Fvar06405-1.2	laccase-1-like	61,5513	21,8216	1,50
	Fvar10866-1.2	methionine sulphoxide reductase A	58,3686	353,869	-2,60
	Fvar09366-1.2	HPX1	3,83499	8,35084	-1,12
	Fvar05186-1.2	glutathione peroxidase-like 1	643,078	1022,34	-0,67
Fvar06172-1.2	methionine-R-sulfoxide reductase B1	129,887	272,179	-1,07	

(Continua...)



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Categoria	Fvar GeneID	Nome do gene	Recém-emergida	Forrageira	Log2 FC
Desenvolvimento	Fvar01850-1.2	TCTP1 (putative reference gene)	3055,36	1649,99	0,89
	Fvar00764-1.2	RPL32 (putative reference gene)	3998,3	1557,29	1,36
	Fvar10730-1.2	germ cell-expressed Protein (GCE)	20,0039	11,5155	0,80
	Fvar10176-1.2	hexamerina 110	15,7261	0,476521	5,04
	Fvar11973-1.2	hexamerina 70 (a/b?)	2,60202	0,0242664	6,74
	Fvar05113-1.2	hsc70-5	513,332	328,886	0,64
	Fvar12564-1.2	DNA (cytosine-5) methyltransferase 3 (dmnt3)	9,71015	1,69018	2,52
	Fvar13963-1.2	RSOD	33,9266	3,40485	3,32
	Fvar11800-1.2	nuclear receptor HR3	1,03235	0,310732	1,73
	Fvar06282-1.2	epidermal growth factor receptor (EGFR)	13,8583	5,57912	1,31
	Fvar13774-1.2	ultraspiracle (USP)	23,0532	13,419	0,78
	Fvar13766-1.2	myosin heavy chain	189,552	109,831	0,79
	Fvar04762-1.2	myosin regulatory light chain	3757,94	700,131	2,42
	Fvar09175-1.2	peritrophin P3 analogous	334,338	1,68702	7,63
	Fvar09960-1.2	yellow-y precursor	205,954	0,649661	8,31
	Fvar09254-1.2	period (Per)	19,4417	31,8034	-0,71
	Fvar13074-1.2	cycle (Cyc)	18,9486	74,8685	-1,98
	Fvar08364-1.2	kruppel homolog 1 (Kr-h1)	6,29105	12,9782	-1,04
	Fvar13674-1.2	calponin (chd64)	190,26	377,36	-0,99
	Fvar13973-1.2	ecdysone-induced protein 75 (E75)	19,2741	29,3356	-0,61
Fvar06562-1.2	DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 b (DNMT1b)	5,11506	8,68931	-0,76	
Fvar07404-1.2	chico	8,73963	15,025	-0,78	
Fvar03416-1.2	foxo	13,7002	38,451	-1,49	
Fvar05922-1.2	DOR	14,5831	57,6099	-1,98	
Fvar12003-1.2	insulin growth factor (IGF)	3,22197	12,283	-1,93	
Resposta Imune / Defesa	Fvar12542-1.2	SPZ5	13,5994	2,52672	2,43
	Fvar12802-1.2	SPZ3	11,8328	0,479884	4,62
	Fvar03150-1.2	hymenoptaecin	900,81	237,136	1,93
	Fvar05787-1.2	DOME	16,3834	28,3245	-0,79
	Fvar01479-1.2	SPZ1B	22,983	59,762	-1,38
	Fvar09614-1.2	SPZ4	4,43569	74,3376	-4,07
	Fvar06160-1.2	apidaecin	177,795	568,871	-1,68
	Fvar08070-1.2	TOLL1	55,6503	117,29	-1,08
	Fvar08682-1.2	STAT	38,619	56,5369	-0,55
	Fvar08852-1.2	defensin 1	200,411	753,294	-1,91
	Fvar11132-1.2	abaecin	20,6559	121,878	-2,56
	Fvar11817-1.2	dorsal X1	28,5577	44,9953	-0,66
	Fvar03195-1.2	relish	41,0479	68,9888	-0,75

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

A família de genes citocromo P450 é um clado incrivelmente diverso e conservado (Cohen & Feyereison 1995) conhecidos por serem componentes nas vias de degradação e desintoxicação xenobiótica e pode ser transcricionalmente regulados por variáveis abióticas como radiação e temperatura (Shi et al. 2013). Os variados perfis de expressão dos genes P450 em nosso estudo via RT-PCR geralmente concordam com os achados de RNA-seq. O gene P450 *baq1* foi encontrado igualmente expresso entre os três grupos etários testados, então podemos concluir que a expressão desse gene não depende na idade e fase de desenvolvimento da abelha. Embora a sensibilidade da *F. varia* aos pesticidas seja desconhecida pela ciência, a expressão uniforme de P450 *baq1* em todas as faixas etárias desta abelha o torna candidato para pesquisas futuras após exposição de abelhas a pesticidas. Se esse gene tiver um papel na desintoxicação de pesticidas, altos níveis de expressão desse gene em diferentes faixas etárias podem promover resistência a pesticidas e permitir que essa abelha seja mais amplamente utilizada em serviços de polinização.

Os genes da família *Halloween*, *shade* e *spook* são muito ativos em vias de biossíntese de proteínas ligadas à ecdise, que ocorre em fases imaturas (Petryk et al. 2003; Namiki et al. 2005). Embora a via de metamorfose da 20-hidroxisfisona (20E) seja conhecida como mais ativa em pupas, ela também está presente em adultos (Ishimoto & Kitamoto 2010) e está envolvida em processos que vão além da metamorfose, como comportamento e longevidade (Schweddes & Carney 2012). A presença de *shade* e *spooky* em adultos, constituintes da cascata da 20E, é melhor compreendida nesse contexto, pois os adultos não passam pelo processo de metamorfose. Nossos resultados fornecem ótimas razões para outros estudarem genes principalmente associados à metamorfose que ainda são expressos em adultos estruturalmente completos. Mais estudos podem ser realizados para descobrir se a expressão de *shade* e *spook* está de alguma forma relacionada com vias de ecdisteroides e a morte celular programada do ovário exibida por operárias de *F. varia*.

Dos 18 genes citocromo P450 avaliados por RNA-seq nessa pesquisa, 12 foram mais altamente expressos em forrageiras (Fg) do que em adultos recém-emergidas (RE). Como os P450s

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

são enzimas envolvidas em reações desintoxicantes, é compreensível especular que as maiores quantidades de transcritos nas forrageiras ajudam como um mecanismo de defesa contra ameaças xenobióticas. A menor expressão de genes codificadores de enzimas desintoxicantes P450 em recém-emergidos pode ser visto como um trade-off energético, enquanto um indivíduo que reside dentro da colmeia estão socialmente protegidos necessidade relativamente menor para se defenderem de patógenos e xenobióticos. Desta forma, podem dedicar mais energia para avançarem em seus ciclos de desenvolvimento e para tarefas dentro da colônia. Scott (1999) observou que os níveis dos citocromo P450s oscilam durante os estágios de desenvolvimento larval, desaparecem nas pupas e são novamente elevados em adultos. Vannette et al. 2015 descobriu que vários genes-chave da família P450 implicados na desintoxicação fitoquímica (*cyp6ar*, *cyp6as*, *cyp6bd*, *cyp9q*) são muito mais expressos nas forrageiras do que no desenvolvimento de pupas e adultos recém-emergidos. Nossos resultados indicam que *F. varia* tem um padrão similar de expressão de genes P450 com níveis significativamente maiores de expressão de *cyp6as5*, *cyp6ar1*, *cyp6a17*, *cyp9q1* e *cyp6bd1* em forrageiras quando comparados aos das operárias mais jovens.

Do ponto de vista evolutivo, a expressão elevada de genes de desintoxicação fitoquímica entre as forrageiras é coerente com o seu papel na coleta de néctar e pólen. Vannette et al. 2015 também observou uma up regulação do gene P450 *6bd1* em forrageiras, bem como quantidades geralmente abundantes de transcritos relacionados como AMPs e genes de desintoxicação e metabolismo xenobiótico em forrageiras. Esses níveis elevados de transcrição se refletirem também na abundância de proteínas traduzidas são, sem dúvida, uma proteção contra os riscos ambientais encontrados fora da colmeia. É mais um exemplo de uma *arms race* biológica entre insetos e plantas, já que as forrageiras devem ser capazes de se desintoxicarem dos compostos de defesa encontrados em muitas angiospermas.

Por outro lado, o gene P450 *6as12* foi significativamente up regulado no recém-emergidas com um aumento de mais de três vezes em relação às forrageiras. Embora este gene seja muito pouco

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

estudado, tem sido implicado na comunicação olfativa (Wang et al. 2017). Os himenópteros (dentre eles os *Meliponini*) são conhecidos por produzir hidrocarbonetos cuticulares (CHCs) para a comunicação (Couvillion & Ratnieks 2007), pode ser que esse gene atue em uma via de sinalização na qual o indivíduo alerte sua presença para seus parentes. Calla et al. 2018 concluiu que um membro da família P450, *cyp4g11*, está envolvido na eliminação de odores e na produção de CHCs. A expressão de P450 *cyp4g11* aumentou durante a idade adulta e atingiu o pico em forrageiras, reforçando a compreensão da funcionalidade deste gene: o aumento de CHCs em forrageiras reduziria a chance de dissecação fora da colmeia, e, a capacidade de reduzir feromônios e compostos desconhecidos obtidos durante a atividade de forrageamento facilitaria o reconhecimento por parentes após o retorno à colmeia.

Curiosamente, *A. mellifera* é conhecida por possuir menos da metade da quantidade de genes P450 quando comparada a *A. gambiae* e *D. melanogaster* (Claudianos et al. 2006). A grande parte da sensibilidade das abelhas a pesticidas se origine de sua falta de enzimas de detoxificação do P450 dentro do genoma, e sabe-se que os P450s são ativos na inibição de pesticidas como o imidacloprida (Shi et al. 2009). Assim, sugere-se então que a up regulação desses genes seria benéfico para a *F. varia* na degradação desses xenobióticos.

Carboxil/colinesterases (CCEs) são uma classe importante de proteínas com diversas funções que vão desde a desintoxicação, secreções hormonais e desenvolvimento (Claudianos et al. 2006). O membro mais conhecido deste clado encontrado em himenópteros é o gene esterase do hormônio juvenil (*juvenile hormone esterase, jhe*), que atua na redução dos níveis de hormônio juvenil (HJ) em operárias jovens de *A. mellifera* (Bomtorin et al. 2014). Investigar a expressão do *jhe* foi fundamental para sugerirmos potenciais relações genéticas e hormonais, já conhecidas no campo da entomologia, como a hipótese do duplo repressor entre a *vg* e o HJ (Amdam e Omholt 2003). Foi um ótimo candidato, pois sua expressão varia entre os grupos etários conforme o esperado. Nossos resultados se aproximam dos dados encontrados em outros clados de insetos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

A inclusão de hormônio juvenil (HJ) e vitelogenina (*vg*) é fundamental para qualquer estudo que investigue o desenvolvimento de himenópteros. Esses dois genes são um caso clássico de *feedback* em uma relação inversa onde o aumento de HJ indica a menores níveis de *vg*. O papel do gene *juvenile hormone esterase (jhe)*, portanto, é o de regular o HJ. Nossos dados sugerem pela primeira vez em *F. varia* a relação entre *jhe* e *vg* suportada com dados empíricos. A alta expressão do *jhe* nas fases jovem e intermediária potencialmente reduzem os títulos de HJ na hemolinfa, aumentando assim a expressão de *vg*, que depois se invertem com o avanço da idade e mudanças comportamentais da abelha.

O padrão de expressão de *vg* observado, com baixas quantidades em operárias novas, seguido por um aumento no estágio intermediária e depois um declínio acentuado em forrageiras, se assemelham ao padrão encontrado por Amdam & Omholt (2002) em *A. mellifera*. No entanto, em *F. varia*, Dallacqua et al. (2007) observaram que os transcritos e proteínas de *vg* são consistentemente expressos a partir de pupas e por todo o desenvolvimento adulto. Estes diferentes resultados podem ser explicados pois cada estudo utilizou diferentes fontes de material biológico: usamos corpos inteiros, enquanto que Dallacqua et al. (2007) usaram apenas abdomens. Sabe-se que a *vg* tem um papel funcional na produção de vitelo nos ovos de insetos (Guidugli et al. 2005, Havukainen et al. 2013), mas em uma operária estéril de *F. varia* com ovários subdesenvolvidos e sem uso para *vg* em vitelogênese, é sugerido que o *vg* tenha um papel alternativo (Hartfelder et al. 2006) como uma proteína de armazenamento (Dallacqua et al. 2007).

Usando os dados do RNA-seq, observamos um aumento de 1,2 vezes de *jhe* nas recém-emergidas comparado às forrageiras corrobora os dados de Bordier et al. (2016) que também demonstram que a expressão do *jhe* é alto entre os adultos mais jovens e diminui durante o forrageamento, quando altos títulos de HJ são necessários às últimas tarefas polieticas. O hormônio juvenil (HJ) é um sesquiterpenoide extremamente importante e que participa de inúmeras vias de desenvolvimento até a modulação do comportamento (Guidugli et al. 2005; Ament et al. 2012;

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Cardoso-Junior et al. 2017). Vários componentes formam um complexo proteico que se liga ao HJ e contribui para um *feedback* positivo que promove outros processos, como as vias de regulação de ecdisteroides e o próprio comportamento (Liu et al. 2011; Ament et al. 2012).

Os genes *gce* (*met*), *usp*, *calponin* (*chd64*) e *kruppel* formam um complexo proteico que atua como receptor/ligantes para o HJ (Jindra et al. 2015; Pandey & Bloch 2015). Tanto a *gce* quanto a *usp* se mostraram mais altamente expressos em tegumentos de operárias recém-emergidas, enquanto a *calponin*, *kruppel* e um dos produtos dessa cascada química, *E75*, foram mais altamente expressos em tegumentos de forrageiras. O gene *kruppel* é induzido por HJ durante a metamorfose e também é regulado por HJ no tegumento abdominal e presente durante o desenvolvimento inicial do adulto (Minakuchi et al. 2008). A regulação positiva de *kruppel* no tegumento das operárias adultas do estudo acima mencionado coincide com a up regulação observada de *kruppel* em forrageiras de analisadas em nossa pesquisa. Isso mais uma vez destaca as similaridades do genoma e dos níveis de expressão entre *A. mellifera* e *F. varia*.

Além disso, os receptores nucleares *E75* e *hr3*, ambos fatores de transcrição em cascatas ecdisteroides, exibiram regulação diferencial em tegumentos de *F. varia*. A premissa sugerida em Hannas et al. (2010) que *hr3* é negativamente regulado por *E75* também é verdade em *F. varia*, pois observamos que *hr3* foi up regulado em recém-emergidas e *E75* foi up regulado em forrageiras. No entanto, a descoberta mais importante e relevante entrelaçando *hr3* e *E75* foi a enunciada por Kamae et al. (2014), que conectaram esses dois genes à regulação de processos de desenvolvimento e comportamento com genes do relógio circadiano *cyc* e *tim*. O *knockdown* de qualquer um dos fatores nucleares *hr3* ou *E75* causou oscilações na expressão dos genes do relógio. Dados de RNA-seq de nosso estudo são os primeiros a mostrar este processo em *F. varia* com dois genes circadianos, *per* e *cyc*, sendo up regulados em forrageiras, enquanto *hr3* foi down regulado simultaneamente durante esse mesmo estágio, validando a natureza oscilante desses circuitos genéticos como proposto em Kamae et al. (2014).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Voltando à discussão sobre genes de detoxificação, Glutathione S-Tranferases (GSTs) são um componente essencial do metabolismo xenobiótico e proteção contra o dano oxidativo que pode ser encontrado no citosol e nas mitocôndrias de todos os eucariotos (Sheehan et al. 2001, Corona & Robinson 2006). Puramente enzimas em sua função, GSTs catalisam uma molécula de glutathione ligada a um xenobiótico, transformando o composto em um conjugado de glutathione-S que é mais facilmente degradado e expelido do organismo (Hayes & McLellan 1999, Simic et al. 2009). As GSTs variam em função e os genes desta família podem ter, individualmente, papéis antioxidantes ou de detoxificação. No contexto de *F. varia*, a compreensão dos níveis de expressão de GSTs ao longo dos três estágios de desenvolvimento aqui analisados ajudam na compreensão de como esses insetos detoxificam substâncias exógenas e eliminam as ROS nocivas geradas pelos processos normais de respiração aeróbica. Mais uma vez, a redução drástica de famílias GST dentro do genoma da abelha em comparação a outros insetos é suspeita de ser a causa de sua sensibilidade a xenobióticos, como pesticidas (Claudianos et al. 2006). Na família de genes GST, uma grande variação foi encontrada nos perfis de expressão entre os grupos etários. Enquanto *gst-s1* exibe expressão semelhante entre cada grupo etário, a expressão de *gst-s4* é mais profundamente expressa nas categorias nova e intermediária. A expressão uniforme de *gst-s1* indica que a função do gene é importante em todos os três estágios de desenvolvimento, ainda que seu papel específico como antioxidante ou mecanismo de detoxificação seja ainda desconhecido. O *gst-s4*, no entanto, pode estar diretamente relacionada a uma tarefa *in-hive* e não necessariamente tem um papel de antioxidante que reduz ROS gerados em forrageiras.

Dos três genes GST diferencialmente expressos em *F. varia* nos dados de RNA-seq de tegumento, dois são regulados negativamente em forrageiras (*gst-u1*, *gst-d1*) e um é regulado positivamente em forrageiras (*gst-d1*). Pesquisa semelhante conduzida por Vannette et al. 2015 descobriu que as GSTs são mais expressas nos tubos de Malpighian de forrageiras do que de operárias, indicando ainda um papel de desintoxicação, uma vez que este órgão trata a excreção e as forrageiras

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

têm maior probabilidade de encontrar xenobióticos que precisam ser excretados em relação às operárias mais jovens. A divergência de resultados destaca o ponto em que estudos mais específicos desses genes seriam necessários para tirar conclusões sobre a expressão diferencial de GSTs em *F. varia*. Dados de RNA-seq mostram também um aumento de duas vezes na *gst-s1* em recém-emergidas, enquanto o *gst-s4* é up regulado nas forrageiras. Nossos dados sugerem que os variados níveis de expressão em toda a família indicam que cada gene específico pode ser adaptado para combater um tipo de xenobiótico específico ou reduzir o dano oxidativo em um estágio de desenvolvimento particular. A expressão de GST em *F. varia* não indica plasticidade, mas sim a probabilidade do papel estreito que cada gene desempenha. Se as GSTs são de fato capazes de desintoxicar pesticidas, seria importante investigar os possíveis usos de técnicas modernas, tais como RNAi para modular níveis de transcrição de GST em abelhas experimentalmente expostas a pesticidas. Além disso, Riveron et al. (2014) mostraram que a regulação positiva de *gst2* com uma única mutação de ponto exibiu níveis aumentados de resistência metabólica a pesticidas. Como *A. mellifera* é conhecido por possuir os níveis mais altos de recombinação meiótica em metazoários (Beye et al. 2006), o aparecimento de uma nova sequência ou mutação é mais provável, permitindo taxas mais altas de evolução genômica e um maior chance de observar fenótipos mais adaptados em desintoxicar os pesticidas. No entanto, é atualmente desconhecido qual dos genes GST serviria como um candidato para essa pesquisa e mais estudos precisam ser feitos com essa família de genes.

A produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) por meio do metabolismo aeróbico eucariótico é um processo potencialmente prejudicial que pode levar a danos oxidativos em organelas, como as mitocôndrias (Corona & Robinson 2006, Hekimi et al. 2011). As enzimas antioxidantes, portanto, evoluíram para proteger os componentes celulares contra danos oxidativos. Em Hymenoptera, os três grupos mais proeminentes de enzimas antioxidantes são as catalases, as superóxido dismutases e as peroxidases, cada um com seu próprio mecanismo de ação. Mais importante ainda, os antioxidantes reduzem os radicais livres dentro da célula e inibem a oxidação



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

prejudicial de moléculas pela partilha de elétrons entre os antioxidantes e os radicais livres, resultando em estabilização molecular (Corona & Robinson 2006, Carochó & Ferreira 2013).

Dois genes antioxidantes pesquisados, catalase (*cat*) e superóxido dismutase 2 (*sod2*) apresentaram perfis de expressão semelhantes em cada faixa etária estudada. Para ambos, os estágios nova e intermediária foram estatisticamente iguais, enquanto em forrageiras foi muito menos expresso.

Dados de RNA-seq indicam uma “divisão” na expressão de antioxidantes, com metade dos genes, incluindo *sod2*, sendo up regulados durante o estágio recém-emergido. Os dados do Falcón (2015) revelam a expressão diferencial de dois genes da peroxidase, o *hpx-6* (regulado para cima nas recém-emergidas) e o *hpx-1* (regulado para cima nas forrageiras). Embora ambos estejam implicados nas atividades de ligação à heme e antioxidante, é interessante notar como dois genes muito semelhantes com uma ontologia compartilhada podem ter essa expressão diferencial durante as fases de desenvolvimento. Um dos genes antioxidantes mais amplamente estudados, *mnsod1*, foi regulado positivamente em recém-emergidas com o dobro da expressão quando comparado às forrageiras. Isso sugere que a *mnsod1* pode ter uma função diretamente relacionada às tarefas *in-hive*. Collins et al. (2004) pesquisou a abundância de expressão de *sod* em rainhas virgens, rainhas acasaladas e zangões, descobrindo que a expressão de *sod* mudou pouco entre abelhas de três semanas de idade e aquelas com um ano de idade. A diversidade e abundância dos genes da superóxido dismutases e antioxidantes em geral explica os papéis diferenciados de expressão entre as fases do desenvolvimento.

Embora as ROS sejam elevadas em forrageiras devido à respiração aeróbia associada ao vôo, Margotta et al. (2018) descobriram que a atividade da *cat* não era up regulada no cérebro, mas era mais altamente expressa em forrageiras de meia-idade. No mesmo estudo, a expressão de *sod* diminuiu com a idade da forrageira, levando à conclusão de que o acúmulo de ROS não é diretamente ligado a ativação antioxidante e que um componente genético inerente desconhecido tem um papel regulatório nesses genes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

O incrivelmente conservado e importante gene *hsp90* foi encontrado em nosso estudo como expresso em um nível relativamente alto em operárias novas, sendo gradualmente reduzido nos estágios de intermediárias e forrageiras. O cognato de choque térmico 70 (*hsc-70*) também foi mais expresso em tegumento de recém-emergidas. Embora as proteínas de choque térmico possam estar envolvidas em inúmeras tarefas, tais como funções de transporte e de dobramento proteico, elas podem ser transcricionalmente reguladas durante períodos de estresse na célula (Beere 2004). McKinstry et al. (2017) descobriram que as proteínas de choque térmico foram realmente reguladas para baixo quando as respostas imunes humorais foram simultaneamente ativadas em *Apis mellifera*. Isso pode ajudar a explicar nossos resultados se considerarmos que as forrageiras pesquisadas estavam em contato com tensões externas à colmeia, que então regulam essas proteínas de choque térmico.

As vias moleculares envolvidas na resposta imune e defesa antimicrobiana são moduladas por numerosos genes que participam de reações em cascata. Os fatores de transcrição *relish* e *dorsal* são constituintes nas vias imunológicas, Imd e Toll, respectivamente. Cada um participa de uma cascata enzimática que produz efetores antimicrobianos e suspeita-se que podem até participar do processo de melanização. *Relish* e *dorsal* são significativamente mais expressos em abelhas novas, fornecendo evidências de papéis alternativos desses genes, além daqueles descritos em Evans et al. 2006. Um desses caminhos é o Toll, um mecanismo de defesa dos himenópteros contra bactérias e fungos invasores. Nesta cascata *spatzle* (*spz*) interage com o Toll na membrana celular e desencadeia novas reações, incluindo a indução de *relish* que leva à produção de proteínas antimicrobianas (Evans et al 2006). Nossos dados nos grupos etários mostram que o *relish* é significativamente expresso em abelhas mais novas, mas os dados de RNA-seq correspondentes revelam que a expressão dos genes *relish*, *toll* e dois *spz* são menores em operárias recém-emergidas. Uma regulação positiva nos genes constituintes da via Toll, juntamente com um aumento nas proteínas antimicrobianas entre as forrageiras, revela que esses indivíduos estão potencialmente interagindo com bactérias e fungos

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

nocivos fora da colmeia, levando à produção de moléculas de defesa. Essa explicação também é válida quando consideramos outra via capaz de produzir moléculas essenciais à defesa de insetos: JAK / STAT. Dados de RNA-seq mostram que os genes *dome* e *stat* são up regulados em tegumentos de forrageiras. Uma outra via de defesa, IMD, viu seus produtos antimicrobianos, *defensina* e *apidaecina*, também se mostraram up regulados em forrageiras. Vannette et al. (2015) produziram resultados semelhantes quando observaram uma up regulação estatisticamente significativa dos AMPs *hymenoptaecin* e *defensin-1*. A grande maioria dos genes de resposta e defesa imunológica pesquisados neste estudo foram up regulados em forrageiras, solidificando nossa hipótese de que dentro das colmeias há poucas razões para se produzir e gastar energia em moléculas de defesa. No entanto, é importante produzir esses compostos apenas quando expostos a bactérias e fungos hostis enquanto fora da colmeia.

Dados de RNA-seq também revelaram up regulação significativa em uma variedade de genes diretamente conectados ao desenvolvimento da cutícula e tegumento. O gene altamente conservado *yellow*, implicado na melanização da cutícula (Nash, 1976, Ferguson et al. 2010), foi up regulada 8 vezes mais em recém-emergidas, enquanto a *myosin heavy chain*, *myosin light regulatory chain* e *peritrofinas* (Odrionitz & Kollmar 2008; Willis 2010; Walsh 2011) também exibiram maior expressão em recém-emergidas. A expressão quase exclusiva dessas genes em operárias novas sugerem participação nos processos de melanização e esclerotização que ainda ocorrem pós-emergência dos indivíduos adultos.

A via de sinalização da insulina (IIS), que tem vários papéis no estresse, desenvolvimento e longevidade, foi outra rota metabólica crítica investigada por causa de sua associação com o HJ (Giannakou & Partridge 2007; Gruntenko & Rauschenbach 2017). Também se demonstrou que o IIS é diferencialmente expresso em larvas de *A. mellifera* rainhas e operárias (de Azevedo & Hartfelder 2008) e que peptídeos *insulin-like* podem influenciar o desenvolvimento de características de castas, como ovários (Wang et al. 2013). O gene *insulin growth factor (igf)* mostrou-se up regulado em

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

forageiras, sugerindo um papel no polietismo e no desenvolvimento temporal em *F. varia*, como em *A. mellifera*.

Os fatores de transcrição *chico* e *foxo* envolvidos na via de sinalização da insulina foram ambos up regulados em tegumentos de forrageiras. O gene *foxo* está associado à apoptose (Essaghir et al. 2008) e, portanto, talvez mais ativo em forrageiras devido à progressão natural da idade. O gene *chico* atua como um substrato no IIS facilitando a interação entre proteínas semelhantes à insulina (*ilp*), *foxo* e *jhe* (Wheeler et al. 2006; Gruntenko & Rauschenbach 2017). A concomitante up regulação de *chico* e *foxo* em forrageiras de *F. varia* concorda com modelos aceitos em *Drosophila* que demonstram que esta abelha brasileira tem comportamento molecular similar a outros insetos bem estudados. Tem sido recentemente demonstrado que os genes amplamente conservados, Epidermal Growth Factor (*egf*) e seu receptor (*egfr*), implicados no crescimento e proliferação celular, estão envolvidos nas vias moleculares que controlam a diferenciação e reprodução de rainhas de *A. mellifera* (Weiduwilt & Moasser 2008; Formesyn et al., 2013). Embora nosso estudo não tenha se concentrado em *F. varia* rainhas, foi decidido ser prudente incluir o *egfr* em nossa pesquisa de genes diferencialmente expressos. *Egfr* foi up regulado no tegumento de recém-emergidas, dando a sugestão que esse gene é importante no desenvolvimento de operárias mais jovens.

A expressão de um único gene metiltransferase de DNA, *dmnt3*, foi investigado, uma vez que a função reguladora de tais moléculas foi ligada a *splicing* alternativo e a reversão de forrageiras a intermediárias via modulação de RNAi (Rasmussen & Amdam 2015). Dados de RNA-seq revelam que o *dmnt3* é altamente regulado em tegumento de operárias recém-emergidas, sugerindo que ele introduz alterações comportamentais que são fundamentais para os insetos eusociais (Li-Byarlay et al. 2013.) Embora que seja importante para conhecer os níveis de expressão gênica entre os grupos etários, mais pesquisas seriam úteis para entender quantos transcritos de mRNA se tornarão proteínas que afetam o fenótipo. A penetrância genética de um gene que codifica uma proteína de detoxificação seria a melhor medida de quão bem uma determinada colônia ou população seria resistente a

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

pesticidas. Se a aptidão geral e a fecundidade de *F. varia* são aumentadas por meio de regulação positiva de um ou mais genes ou enzima de detoxificação, pode, portanto, ser um candidato viável para ser usado na polinização comercial.

O papel das proteínas hexamerinas citoplasmáticas é armazenar aminoácidos que logo serão importantes para o desenvolvimento adulto (Martins et al. 2010). Ambos os genes hexamerinas investigados neste estudo, *hex110* e *hex70b*, mostram alta expressão em recém-emergidas comparado às forrageiras. Embora o RNA-seq utilizado neste estudo tenha utilizado apenas células do tegumento, os dados coincidem com os achados de Ikeda et al. (2010), em que o *hex-110* foi escassamente encontrado em corpos gordurosos de *A. mellifera* adultas, e também com a sugestão de Martins et al. (2011) de que as hexamarinas são necessárias durante os estágios de pupa e adultos iniciais como um meio de armazenar aminoácidos para o crescimento futuro.

Os resultados deste trabalho foram importantes para responder a uma das nossas perguntas iniciais: a genética molecular e a expressão genética observadas em *F. varia* indicam que esta espécie pode ser usada numa forma mais extensa em polinização comercial? A presença de vários genes P450 e a up regulação em forrageiras em muitos deles indicam que *F. varia* pode ter grande potencial para desintoxicar xenobióticos como pesticidas. A expressão elevada dos genes de resposta imune e defesa nas forrageiras também solidifica essa afirmação, pois o aumento do uso de *F. varia* na polinização comercial dependeria da habilidade dessa espécie em se defender da pleora de diversos patógenos que podem ser encontrados em monoculturas e áreas intensamente cultivadas. Para investigar ainda mais o potencial desta espécie como um polinizador mais amplamente utilizado, a próxima etapa seria conduzir um estudo no qual a expressão desses genes é examinada em indivíduos expostos a pesticidas, bactérias e fungos. O aumento da expressão de genes de desintoxicação e defesa, juntamente sem redução no tempo de vida, indicaria que *F. varia* tem a composição genética para sobreviver em um ambiente com maior interação com xenobióticos perigosos e, portanto, a espécie teria a capacidade de se tornar um polinizador mais amplamente utilizado. Nosso estudo, portanto,

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

seria o primeiro estudo a caracterizar a expressão desses genes em *F. varia* e seria a base de pesquisas futuras nessa área.

Com diferenças tão marcantes na expressão de alguns genes entre essas três categorias de desenvolvimento adulto, mais pesquisas de caráter funcional serão importantes para especificar quais deles estão diretamente envolvidos nas vias de desintoxicação e quais estão envolvidos nas vias de desenvolvimento do organismo, em geral, e da cutícula, em particular. Portanto, é difícil especular atualmente por que certos genes podem ser maiores expressos em um grupo sobre o outro e os dados dos genes pesquisados reforçam o atual consenso científico de que, embora a família P450 esteja primariamente envolvida nas vias de desintoxicação e biossíntese, é impossível generalizar as ações individuais de cada gene constituinte deste clado.

O curioso fenômeno da haplodiploidia vale a pena ser discutido no contexto da genética molecular de *F. varia*. Como esta espécie não tem operárias que depositam ovos, a importância da rainha como única fonte de material genética é essencial. Genes citoplasmáticos como os que governam as mitocôndrias são obtidos apenas dos cromossomos da mãe, portanto, o efeito materno da transmissão gênica pode ser profundamente estudado em *F. varia* sem inferência das *laying workers*. A falta de funcionamento dos ovários nas operárias desta espécie, portanto, proporciona à ciência a mais pura forma de haplodiploidia possível, fazendo *F. varia* um candidato de organismo modelo para futuros estudos de insetos.

Os achados deste estudo sugerem uma grande semelhança entre vias de regulação gênica de *F. varia* e o modelo mais estudado, a abelha *A. mellifera*, como observado nas relações entre *jhe* e *vg*, por exemplo. Além disso, os perfis de expressão das moléculas de defesa, como a *defensin-1* e a *apidacin*, estão dentro dos parâmetros lógicos, pois forrageiras dependem mais da expressão desses genes para combater patógenos e outros xenobióticos fora da colmeia. Este estudo iluminou várias regiões do genoma de *F. varia* e utilizou dados experimentais para sugerir razões evolutivas por trás

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

de diferentes níveis de expressão.



## **4. Referências Bibliográficas**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abbo, P., Kawasaki, J., Hamilton, M., Cook, S., DeGrandi-Hoffman, G., & Li, W. et al. (2016). Effects of Imidacloprid and Varroa destructor on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Science*, 24(3), 467-477.
- Aleixo, K., Faria, L., Garáfalo, C., Imperatriz Fonseca, V., & Silva, C. (2013). Pollen Collected and Foraging Activities of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier) (Hymenoptera: Apidae) in an Urban Landscape. *Sociobiology*, 60(3), 266-276.
- Altschul, S. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Alyokhin, A., & Chen, Y. (2017). Adaptation to toxic hosts as a factor in the evolution of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 21(June), 33-38.
- Amdam, G., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. (2003). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1799-1802.
- Amdam, G., & Omholt, S. (2002). The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2), 209-228.
- Amdam, G., & Omholt, S. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), 451-464.
- Ament, S., Wang, Y., Chen, C., Blatti, C., Hong, F., & Liang, Z. et al. (2012). The Transcription Factor Ultraspiracle Influences Honey Bee Social Behavior and Behavior-Related Gene Expression. *Plos Genetics*, 8(3), e1002596.
- Andersen, S., Thompson, P., & Hepburn, H. (1981). Cuticular sclerotization in the honeybee (*Apis mellifera adansonii*). *Journal of Comparative Physiology B*, 145(1), 17-20.
- Aurori, C., Buttstedt, A., Dezmirean, D., Mărghitaş, L., Moritz, R., & Erler, S. (2013). What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin. *The Journals of Gerontology: Series A*, 69(6), 633-639.
- Bagchi, D., Bhattacharya, G., & Stohs, S. (1996). In vitro and in vivo induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. *Toxicology*, 112(1), 57-68.
- Baines, D., Wilton, E., Pawluk, A., de Gorter, M., & Chomistek, N. (2017). Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Scientific Reports*, 7:10979.
- Barchuk, A., Bitondi, M., & Simões, Z. (2002). Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 2(1), 1-8.
- Barchuk, A., Cristino, A., Kucharski, R., Costa, L., Simões, Z., & Maleszka, R. (2007). Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Developmental Biology*, 7(1), 70.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Bauer, D., & Sue Wing, I. (2016). The macroeconomic cost of catastrophic pollinator declines. *Ecological Economics*, 126, 1-13.
- Beere, H. (2004). 'The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2641-2651.
- Beye, M., Gattermeier, I., Hasselmann, M., Gempe, T., Schioett, M., & Baines, J. et al. (2006). Exceptionally high levels of recombination across the honey bee genome. *Genome Research*, 16(11), 1339-1344.
- Biddinger, D., Robertson, J., Mullin, C., Frazier, J., Ashcraft, S., & Rajotte, E. et al. (2013). Comparative Toxicities and Synergism of Apple Orchard Pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). *Plos ONE*, 8(9), e72587.
- Bilandžija, H., Laslo, M., Porter, M., & Fong, D. (2017). Melanization in response to wounding is ancestral in arthropods and conserved in albino cave species. *Scientific Reports*, 7:17148.
- Boleli, I., Paulino-Simes, Z., & Gentile Bitondi, M. (1999). Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. *Journal of Morphology*, 242(3), 271-282.
- Boleli, I., Paulino-Simões, Z., & Bitondi, M. (2000). Regression of the lateral oviducts during the larval-adult transformation of the reproductive system of *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. *Journal of Morphology*, 243(2), 141-151.
- Bomtorin, A., Mackert, A., Rosa, G., Moda, L., Martins, J., & Bitondi, M. et al. (2014). Juvenile Hormone Biosynthesis Gene Expression in the corpora allata of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Female Castes. *Plos ONE*, 9(1), e86923.
- Bordier, C., Suchail, S., Pioz, M., Devaud, J., Collet, C., & Charreton, M. et al. (2016). Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism. *Journal of Insect Physiology*, 98, 47-54.
- Boukraâ, L., Sulaiman, S.A. (2009). Rediscovering the antibiotics of the hive. *Recent Patents on Anti-infective Drug Discoveries*. 4(3):206-13.
- Calla, B., MacLean, M., Liao, L., Dhanjal, I., Tittiger, C., Blomquist, G., & Berenbaum, M. (2018). Functional characterization of CYP4G11-a highly conserved enzyme in the western honey bee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*.
- Calderone, N., & Page, R. (1988). Genotypic variability in age polyethism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 22(1), 17-25.
- Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed May/05/2018.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Canto, A., & Parra-Tabla, V. (2000). Importance of Conserving Alternative Pollinators: Assessing the Pollination Efficiency of the Squash Bee, *Peponapis limitaris* in *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae). *Journal of Insect Conservation*, 4(3), 201-208.
- Cardoso, R. (2010). *Divisão etária de trabalho em operárias de Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Apini). (Bacharelado). Universidade de São Paulo.
- Cardoso-Júnior, C.A.M., Fujimura, P.T., Santos-Júnior, C.D., Borges, N.A., Ueira-Vieira, C., Hartfelder, K., Goulart, L.R., Bonetti, A.M. (2017). Epigenetic modifications and their relation to caste and sex determination and adult division of labor in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Genetics and Molecular Biology*, 40(1):61-68.
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15-25.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387-2391.
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., & Casteels, P. (1994). Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics of the Gene Repertoire and Required Post-translational Conversion Precursor Structures. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569-28575.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R., Biswas, S., Schuler, M., & Berenbaum, M. et al. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 615-636.
- Collins, A., Williams, V., & Evans, J. (2004). Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 13(2), 141-146.
- Cornman, R., Tarpy, D., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., & Pettis, J. et al. (2012). Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *Plos ONE*, 7(8), e43562.
- Corona, M., & Robinson, G. (2006). Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 687-701.
- Corona, M., Libbrecht, R., & Wheeler, D. (2016). Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in social insects. *Current Opinion in Insect Science*, 13, 55-60.
- Couvillon, M., & Ratnieks, F. (2008). Odour transfer in stingless bee marmelada (*Frieseomelitta varia*) demonstrates that entrance guards use an “undesirable-absent” recognition system. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(7), 1099-1105.
- Christen, V., Mittner, F., & Fent, K. (2016). Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 50(7), 4071-4081.
- Costa, T. V., Farias, C.A.G., Brandão, C.S. (2012). Meliponicultura em comunidades tradicionais do Amazonas. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 7(3):106-115.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Cresswell, J. (2010). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157.
- Cruz-Landim, C. (2000). Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera: Apidae): the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. *Genetics And Molecular Biology*, 23(1), 83-88.
- Cruz López, L., Patricio, E., Maile, R., & Morgan, E. (2002). Secretions of stingless bees: cephalic secretions of two Frieseomelitta species. *Journal of Insect Physiology*, 48(4), 453-458.
- Da Cunha, M.A.S., Campos, L.A.O. (1993). Desenvolvimento ovariano em operárias adultas de *Frieseomelitta varia varia* (Lep 1836) (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 53:63-69.
- Da Cunha, M.A.S., Gomes, G.M., Campos, L.A.O. (1986). Desenvolvimento ovariano em operárias adultas de *Frieseomelitta silvestri languida* (Hym Apidae) sob condições normais e de orfandade. *Ciência e Cultura*, 308:1725-1731.
- Da Cunha, M.A.S., Cunha, R.A., Pimental, M.A.L. (1989). Relação entre o desenvolvimento dos ovários e atividade dos corpora allata em operárias de *Frieseomelitta silvestri* (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6:245-254.
- Da Cunha, M.A.S., Campos, L.A.O. (1993). Desenvolvimento ovariano em operárias adultas de *Frieseomelitta silvestri languida* (Hym Apidae) sob condições normais e de orfandade. *Ciência e Cultura*, 308:1725-1731.
- Dallacqua, R. (2005). *Análise comparativa da expressão de vitelogenina em três espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) que diferem quanto à atividade reprodutiva* (Mestre). Universidade de São Paulo.
- Dallacqua, R., Simões, Z., & Bitondi, M. (2007). Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insectes Sociaux*, 54(1), 70-76.
- De Azevedo, S., & Hartfelder, K. (2008). The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development — differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 1064-1071.
- De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *EMBO J*. 21(11):2568-79.
- Dubrovsky E.B. (2005). Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology Metabolism* 16(1): 6-11.
- Du Rand, E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C., & Nicolson, S. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, 5:11779.
- Elias-Neto, M., Soares, M., & Bitondi, M. (2008). Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie*, 40(1), 29-39.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Elias-Neto, M., Soares, M., Simões, Z., Hartfelder, K., & Bitondi, M. (2010). Developmental characterization, function and regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, 40(3), 241-251.
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C., Coffier, P., & Demoulin, J. (2009). The Transcription of FOXO Genes Is Stimulated by FOXO3 and Repressed by Growth Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10334-10342.
- Evans, J., Aronstein, K., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J., & Jiang, H. et al. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656.
- Eyer, M., Dainat, B., Neumann, P., & Dietemann, V. (2017). Social regulation of ageing by young workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Experimental Gerontology*, 87, 84-91.
- Faustino, C.D., Zucchi, R., Nogueira-Ferreira, F.H. (2002) Polietismo etário entre mini-colônias de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Anais do V Encontro sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, S.P.P. 314.
- Ferguson, L., Green, J., Surridge, A., & Jiggins, C. (2010). Evolution of the Insect Yellow Gene Family. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 257-272.
- Figueiredo, G.P., Faustino, C.D., Costa, L.M., Zucchi, R. (2002) Longevidade e polietismo etário em operárias normais de *Frieseomelitta varia* e *Frieseomelitta silvestrii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Anais do V Encontro sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, SP.P. 316.
- Fischman, B.J., Woodard, S.H., Robinson, G.E. (2011). Molecular evolutionary analyses of insect societies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 Suppl 2:10847-54.
- Forfert, N., Troxler, A., Retschnig, G., Gauthier, L., Straub, L., & Moritz, R. et al. (2017). Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity. *PLOS ONE*, 12(10), e0186109.
- Formesyn, E., Cardoen, D., Ernst, U., Danneels, E., Van Vaerenbergh, M., & De Koker, D. et al. (2014). Reproduction of honeybee workers is regulated by epidermal growth factor receptor signaling. *General And Comparative Endocrinology*, 197, 1-4.
- Freire A. C. G., Fernandes A. B. 2018. Gene Idea: online interactive tool for gene architecture. <http://geneidea.com>
- Freitas, B., Imperatriz-Fonseca, V., Medina, L., Kleinert, A., Galetto, L., Nates-Parra, G., & Quezada-Euán, J. (2009). Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332-346.
- Fries, I., Huazhen, W., Wei, S., & Jin, C. (1996). Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie*, 27(1), 3-11.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Gonçalves, P. (2010). *Análise da variabilidade genética de uma pequena população de Frieseomelitta varia (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas* (Mestre). Universidade de São Paulo.
- Gong, Y., & Diao, Q. (2016). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*, 26(1), 1-12.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957-1255957.
- Gregorc, A., Evans, J., Scharf, M., & Ellis, J. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1042-1049.
- Gruntenko, N., & Rauschenbach, I. (2018). The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 258, 134-139.
- Guedes, R., Walse, S., & Throne, J. (2017). Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. *Current Opinion in Insect Science*, 21, 47-53.
- Guidugli, K., Nascimento, A., Amdam, G., Barchuk, A., Omholt, S., Simões, Z., & Hartfelder, K. (2005). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, 579(22), 4961-4965.
- Hannas, B., Wang, Y., Baldwin, W., Li, Y., Wallace, A., & LeBlanc, G. (2010). Interactions of the crustacean nuclear receptors HR3 and E75 in the regulation of gene transcription. *General and Comparative Endocrinology*, 167(2), 268-278.
- Hartfelder, K., Makert, G., Judice, C., Pereira, G., Santana, W., Dallacqua, R., & Bitondi, M. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37(2), 144-163.
- Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., & Amdam, G. (2013). Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28369-28381.
- Hayes, J., & McLellan, L. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273-300.
- Hekimi, S., Lapointe, J., & Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 569-576.
- Hepburn, H.R. (1985). Structure of the integument. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 3. Pergamon Press, Oxford, pp. 1-58.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Ikedo, T., Furukawa, S., Nakamura, J., Sasaki, M., & Sasaki, T. (2011). CpG Methylation in the Hexamerin 110 Gene in the European Honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, *11*(74), 1-11.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T., Belvin, M., Kopczynski, C., & Reichhart, J. et al. (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *98*(26), 15119-15124.
- Ishimoto, H., & Kitamoto, T. (2010). The Steroid Molting Hormone Ecdysone Regulates Sleep in Adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *185*(1), 269-281.
- Jindra, M., Uhlirova, M., Charles, J., Smykal, V., & Hill, R. (2015). Genetic Evidence for Function of the bHLH-PAS Protein Gce/Met As a Juvenile Hormone Receptor. *PLOS Genetics*, *11*(7), e1005394.
- Johnson, B., & Linksvayer, T. (2010). Deconstructing the Superorganism: Social Physiology, Groundplans, and Sociogenomics. *The Quarterly Review of Biology*, *85*(1), 57-79.
- Johnson, R., Mao, W., Pollock, H., Niu, G., Schuler, M., & Berenbaum, M. (2012). Ecologically Appropriate Xenobiotics Induce Cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *Plos ONE*, *7*(2), e31051.
- Junqueira, V., Barros, S., Chan, S., Rodrigues, L., Giavarotti, L., Abud, R., & Deucher, G. (2004). Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, *25*(1-2), 5-16.
- Kamae, Y., Uryu, O., Miki, T., & Tomioka, K. (2014). The Nuclear Receptor Genes HR3 and E75 Are Required for the Circadian Rhythm in a Primitive Insect. *Plos ONE*, *9*(12), e114899.
- Kapheim, K. (2016). Genomic sources of phenotypic novelty in the evolution of eusociality in insects. *Current Opinion in Insect Science*, *13*:24-32.
- Kapheim, K., Pan, H., Li, C., Salzberg, S., Puiu, D., & Magoc, T. et al. (2015). Genomic signatures of evolutionary transitions from solitary to group living. *Science*, *348*(6239), 1139-1143.
- Keller, L., & Jemielity, S. (2006). Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. *Experimental Gerontology*, *41*(6), 553-556.
- Kerr, W., Carvalho, G., Nascimento, V., & Bego, L. (1996). *Abelha urucu*. Belo Horizonte [Brasil]: Acangaú.
- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, *12*(4):357-60.
- King, K., & Lively, C. (2012). Does genetic diversity limit disease spread in natural host populations?. *Heredity*, *109*(4), 199-203.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*. *319*(5871):1827-30.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Klatt, B., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., & Tschardtke, T. (2013). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775), 20132440-20132440.
- Le Conte, Y., Alaux, C., Martin, J., Harbo, J., Harris, J., & Dantec, C. et al. (2011). Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behaviour. *Insect Molecular Biology*, 20(3), 399-408.
- Levitt, A., Singh, R., Cox-Foster, D., Rajotte, E., Hoover, K., Ostiguy, N., & Holmes, E. (2013). Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Research*, 176(1-2), 232-240.
- Li-Byarlay, H., Li, Y., Stroud, H., Feng, S., Newman, T., & Kaneda, M. et al. (2013). RNA interference knockdown of DNA methyl-transferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 110(31), 12750-12755.
- Lima, M.A., Martins, G.F., Oliveira, E.E., Guedes, R.N. (2016). Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *Journal of Comparative Physiology: A, Neuroethology, Sensory, Neural Behavioral Physiology*. 202(9-10):733-47.
- Liu, P., Wang, J., Song, Q., & Zhao, X. (2011). The Participation of Calponin in the Cross Talk between 20-Hydroxyecdysone and Juvenile Hormone Signaling Pathways by Phosphorylation Variation. *Plos ONE*, 6(5), e19776.
- Lockett, G., Almond, E., Huggins, T., Parker, J., & Bourke, A. (2016). Gene expression differences in relation to age and social environment in queen and worker bumble bees. *Experimental Gerontology*, 77, 52-61.
- Lockett, G.A., Kucharski, R., Maleszka, R. (2012). DNA methylation changes elicited by social stimuli in the brains of worker honey bees. *Genes, Brain and Behavior*. 11(2):235-42.
- Lopes, T. F. (2016). *Abordagem comparativa da maturação cuticular em abelhas sócias e solitárias utilizando-se RNA-seq, quantificação de hidrocarbonetos e microscopia eletrônica* (Doutorado). Universidade de São Paulo.
- Lourenço, A. P., Mackert, A., dos Santos Cristino, A., & Simões, Z. (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3), 372-385.
- Mackert, A., do Nascimento, A., Bitondi, M., Hartfelder, K., & Simões, Z. (2008). Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. — Expression analysis and functional assays. *Comparative Biochemistry And Physiology Part B: Biochemistry And Molecular Biology*, 150(1), 33-44.
- Mao, W., Schuler, M., & Berenbaum, M. (2013). Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 110(22), 8842-8846.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Margotta, J. W., Roberts, S. P., Elekonich, M. M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*. Manuscript accepted for publication.
- Marques-Souza, A. (2010). Ocorrência do pólen de *Podocarpus* sp. (Podocarpaceae) nas coletas de *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836 (Apidae: Meliponinae) em uma área de Manaus, AM, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 24(2), 558-566.
- Martins, J., Anhezini, L., Dallacqua, R., Simões, Z., & Bitondi, M. (2011). A Honey Bee Hexamerin, HEX 70a, Is Likely to Play an Intranuclear Role in Developing and Mature Ovarioles and Testioles. *Plos ONE*, 6(12), e29006.
- Martins, J., Nunes, F., Cristino, A., Simões, Z., & Bitondi, M. (2010). The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 23.
- McKinstry, M., Chung, C., Truong, H., Johnston, B., & Snow, J. (2017). The heat shock response and humoral immune response are mutually antagonistic in honey bees. *Scientific Reports*, 7:8850.
- McMahon, D., Fürst, M., Caspar, J., Theodorou, P., Brown, M., & Paxton, R. (2015). A sting in the spit: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *Journal of Animal Ecology*, 84(3), 615-624.
- Meikle, W., Adamczyk, J., Weiss, M., Gregorc, A., Johnson, D., & Stewart, S. et al. (2016). Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Growth and Activity at Three Sites in the U.S. *PLOS ONE*, 11(12), e0168603.
- Michener, C.D. (1969). Comparative social behavior of bees. *Annual Review of Entomology*, 14:299-342.
- Minakuchi, C., Zhou, X., & Riddiford, L. (2008). Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 125(1-2), 91-105.
- Myllymaki, H., Valanne, S., & Ramet, M. (2014). The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3455-3462.
- Namiki, T., Niwa, R., Sakudoh, T., Shirai, K., Takeuchi, H., & Kataoka, H. (2005). Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: A regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 337(1), 367-374.
- Nash, W.G. (1976). Patterns of pigmentation color states regulated by the y locus in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 48:336-343.
- Nebert, D., & Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, 1(6), 460. doi: 10.1186/1479-7364-1-6-460
- Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. Editora Nogueirapis. São Paulo, SP. 445 p.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Nunes, T., Turatti, I., Lopes, N., & Zucchi, R. (2009). Chemical Signals in the Stingless Bee, *Frieseomelitta varia*, Indicate Caste, Gender, Age, and Reproductive Status. *Journal of Chemical Ecology*, 35(10), 1172-1180.
- Oakeshott, J. G., Home, I., Sutherland, T.D., Russell, R.J. (2003). The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology*, 4:202.
- Oakeshott, J., Johnson, R., Berenbaum, M., Ranson, H., Cristino, A., & Claudianos, C. (2010). Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology*, 19, 147-163.
- Odrionitz, F., & Kollmar, M. (2008). Comparative genomic analysis of the arthropod muscle myosin heavy chain genes allows ancestral gene reconstruction and reveals a new type of 'partially' processed pseudogene. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 21.
- Oliveira, F., Absy, M., & Miranda, I. (2009). Recurso polínico coletado por abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponinae) em um fragmento de floresta na região de Manaus - Amazonas. *Acta Amazonica*, 39(3), 505-518.
- Page, R.E. & Amdam, G.V. 2007. The making of a social insect: developmental architectures of social design. *Bioessays*. 29 (4): 334-343.
- Pandey, A., & Bloch, G. (2015). Juvenile hormone and ecdysteroids as major regulators of brain and behavior in bees. *Current Opinion in Insect Science*, 12, 26-37.
- Petryk, A., Warren, J., Marques, G., Jarcho, M., Gilbert, L., & Kahler, J. et al. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, 100(24), 13773-13778.
- Potts, S., Biesmeijer, J., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353.
- Rasmussen, E., & Amdam, G. (2015). Cytosine modifications in the honey bee (*Apis mellifera*) worker genome. *Frontiers in Genetics*, 6.
- Riveron, J., Yunta, C., Ibrahim, S., Djouaka, R., Irving, H., & Menze, B. et al. (2014). A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biology*, 15(2), R27.
- Robinson, G., Fahrbach, S., & Winston, M. (1997). Insect societies and the molecular biology of social behavior. *Bioessays*, 19(12), 1099-1108.
- Roldão, Y. (2011). *Termorregulação colonial e a influência da temperatura no desenvolvimento da cria em abelhas sem ferrão, Melipona scutellaris (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)* (Mestre). Universidade de São Paulo.
- Rothenbuhler, W.C. (1964). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed blood. *American Zoologist*, 4:111-23.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000 Oct; 16(10):944-5.
- Santos, A., Bitondi, M., & Simões, Z. (2001). Hormone-dependent protein patterns in integument and cuticular pigmentation in *Apis mellifera* during pharate adult development. *Journal of Insect Physiology*, 47(11), 1275-1282.
- Schluns, H., & Crozier, R. H. (2007). Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honey bee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology*, 16(6), 753-759.
- Schwedes, C., & Carney, G. (2012). Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 58(3), 293-302.
- Scott, J. (1999). Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(9), 757-777.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V., & Dowd, C. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1-16.
- Shi, X., Dick, R., Ford, K., & Casida, J. (2009). Enzymes and Inhibitors in Neonicotinoid Insecticide Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4861-4866.
- Shi, W., Sun, J., Xu, B., & Li, H. (2013). Molecular Characterization and Oxidative Stress Response of a Cytochrome P450 Gene (CYP4G11) from *Apis cerana cerana*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 68(c), 509-521.
- Shi, Y.Y., Yan, W.Y., Huang, Z.Y., Wang, Z.L., Wu, X.B., Zeng, Z.J. (2013). Genome wide analysis indicates that queen larvae have lower methylation levels in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*. 100(2):193-7.
- Silva, W.S., Lima da Paz, J.R. (2012). Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. *Natureza on line*, 10(3), 146-152.
- Simic, T., Savic-Radojevic, A., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., & Mimic-Oka, J. (2009). Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nature Reviews Urology*, 6(5), 281-289.
- Simola, D., Wissler, L., Donahue, G., Waterhouse, R., Helmkampf, M., & Roux, J. et al. (2013). Social insect genomes exhibit dramatic evolution in gene composition and regulation while preserving regulatory features linked to sociality. *Genome Research*, 23(8), 1235-1247.
- Soares, M., Silva-Torres, F., Elias-Neto, M., Nunes, F., Simões, Z., & Bitondi, M. (2011). Ecdysteroid-Dependent Expression of the Tweedle and Peroxidase Genes during Adult Cuticle Formation in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Plos ONE*, 6(5), e20513.
- Sohal, R., & Orr, W. (2012). The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(3), 539-555.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Steenman, M., Rainier, S., Dobry, C., Grundy, P., Horon, I., & Feinberg, A. (1994). Erratum: Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nature Genetics*, 8(2), 203-203.
- Tarpy, D. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1510), 99-103.
- Terada, Y. (1974). *Contribuição ao estudo da regulação social em Leurotrigona muelleri e Frieseomelitta varia (Hymenoptera, Apidae)* (Mestre). Universidade de São Paulo.
- Tesovnik, T., Cizelj, I., Zorc, M., Čitar, M., Božič, J., Glavan, G., & Narat, M. (2017). Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and Varroa mites (*Varroa destructor*). *PLOS ONE*, 12(10), e0187079.
- Tosi, S. & Nieh, J. (2017). A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Scientific Reports*, 7:1201.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L. (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3):562–578.
- VanEngelsdorp, D., & Meixner, M. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S80-S95.
- Vannette, R., Mohamed, A., & Johnson, B. (2015). Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports*, 5:16224.
- Venturieri, G. (2008). Criação de abelhas indígenas sem ferrão. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental.
- Vincent, J., & Wegst, U. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development*, 33(3), 187-199.
- Wang, Y., Azevedo, S., Hartfelder, K., & Amdam, G. (2013). Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Experimental Biology*, 216(23), 4347-4357.
- Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A., Robinson, G.E. (2006). Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314(5799):645-7.
- Wang Y., Kocher, S.D., Linksvayer, T.A., Grozinger, C.M., Page, R.E. Jr, Amdam, G.V. (2012). Regulation of behaviorally associated gene networks in worker honey bee ovaries. *Journal of Experimental Biology*. 215(Pt 1):124-34.
- Wang, S., Yi, J., Yang, S., Liu, Y., Zhang, J., & Xi, J. (2017). Identification and characterization of microRNAs expressed in antennae of *Holotrichia parallela* and their possible roles in olfactory regulation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 94(1), e21369.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Walsh, M. (2011). Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: Mechanism, function, and pathological implications. *IUBMB Life*, 63(11), 987-1000.
- Weirich, G., Collins, A., & Williams, V. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3-14.
- Wheeler, D., Buck, N., & Evans, J. (2006). Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 597-602.
- Wieduwilt, M., & Moasser, M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(10), 1566-1584.
- Willis, J.H. (2010). Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40:189–204.
- Winston, M. (1991). *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge Mass.: Harvard Univ. Press.
- Wilson, M., Mattson, M.P., Zou, S. (2013). Invertebrates as workhorses for aging and intervention studies. *Ageing Research Reviews*. 12(1):402-3.
- Woodard, S.H., Fischman, B.J., Venkat, A., Hudson, M.E., Varala, K., Cameron, S.A., Clark, A.G., Robinson, G.E. (2011). Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18):7472-7.
- Wu, J., Anelli, C., & Sheppard, W. (2011). Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. *Plos ONE*, 6(2), e14720.
- Yamazaki, Y., Kiuchi, M., Takeuchi, H., & Kubo, T. (2011). Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5), 283-293.
- Yan, H., Simola, D., Bonasio, R., Liebig, J., Berger, S., & Reinberg, D. (2014). Eusocial insects as emerging models for behavioural epigenetics. *Nature Reviews Genetics*, 15(10), 677-688.
- Zanger, U., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103-141.
- Zufelato, M., Bitondi, M., Simões, Z., & Hartfelder, K. (2000). The juvenile hormone analog pyriproxyfen affects ecdysteroid-dependent cuticle melanization and shifts the pupal ecdysteroid peak in the honey bee (*Apis mellifera*). *Arthropod Structure & Development*, 29(2), 111-119.



## **5. Anexo**

ANEXO 1: Lista das categorias funcionais e dos 143 genes investigados no presente estudo.

Categoria	Fvar Gene ID	Nome do gene
CCE	Fvar07677-1.2	esterase B1-like
	Fvar05981-1.2	39S ribosomal protein L35
	Fvar03302-1.2	esterase A2
	Fvar10984-1.2	collagen alpha-1(IV) chain isoform x1
	Fvar03302-1.2	carboxylesterase
	Fvar03302-1.2	esterase FE4-like x1
	Fvar12278-1.2	esterase FE4-like
	Fvar03731-1.2	esterase FE4-like
	Fvar12039-1.2	esterase E4-like
	<b>Fvar09678-1.2</b>	<b>juvenile hormone esterase (jhe)</b>
	Fvar09678-1.2	venom carboxylesterase-6
	Fvar00690-1.2	venom carboxylesterase-6 x1
	Fvar05174-1.2	venom carboxylesterase-6-like
	Fvar09853-1.2	esterase E4-like
	Fvar08305-1.2	carboxylesterase clade I
	Fvar12952-1.2	acetylcholinesterase x1
	Fvar13403-1.2	acetylcholinesterase 2
	Fvar01298-1.2	neuroigin-4, Y-linked
	Fvar10993-1.2	neuroigin 1
	Fvar09585-1.2	nucleolar GTP-binding protein 1
	Fvar01848-1.2	neuroigin 5
	Fvar10782-1.2	neuroigin 3
	Fvar12393-1.2	neuroigin 4
	Fvar05762-1.2	neurotactin
	P450	Fvar06382-1.2
Fvar11174-1.2		probable cytochrome P450 6a14
Fvar12670-1.2		probable cytochrome P450 6a14
Fvar03310-1.2		cytochrome P450 6a2
Fvar12670-1.2		cytochrome P450 6A1 x1
Fvar12670-1.2		probable cytochrome P450 6a14
Fvar03310-1.2		probable cytochrome P450 6a13
Fvar03310-1.2		probable cytochrome P450 6a14
Fvar08135-1.2		probable cytochrome P450 6a17
Fvar12670-1.2		probable cytochrome P450 6a13 (partial)
Fvar08135-1.2		probable cytochrome P450 6a17
Fvar12669-1.2		cytochrome P450 6AS5
Fvar05229-1.2		cytochrome P450 6A1 x1
Fvar03310-1.2		probable cytochrome P450 6a14
Fvar03310-1.2		probable cytochrome P450 6a14 (partial)
Fvar03553-1.2		probable cytochrome P450 6a13
Fvar06199-1.2		cytochrome P450 6k1
Fvar05458-1.2		cytochrome P450 6k1 x1
Fvar11398-1.2		cytochrome P450 9e2-like
Fvar11398-1.2		membralin-like x1
Fvar11836-1.2		cytochrome P450 9e2
Fvar12665-1.2		cytochrome P450 9e2
Fvar12664-1.2		uncharacterized LOC725621
Fvar02593-1.2		cytochrome P450 9e2
Fvar02542-1.2		cytochrome P450 4c3
Fvar02069-1.2		cytochrome P450 4C1
Fvar00592-1.2		cytochrome P450 4G11
Fvar10061-1.2		methyl farnesoate epoxidase (mfe)
Fvar07457-1.2		cytochrome P450 18a1
Fvar07242-1.2		probable cytochrome P450 303a1
Fvar10751-1.2		probable cytochrome P450 305a1
Fvar04502-1.2		cytochrome P450 306a1 x1
Fvar00240-1.2		<b>cytochrome P450 307a1 shade</b>
Fvar00898-1.2	28S ribosomal protein S7, mitochondrial x1	
Fvar07987-1.2	methyl farnesoate epoxidase x1	
Fvar11633-1.2	probable cytochrome P450 301a1, mitochondrial	
Fvar09236-1.2	cytochrome P450 302a1, mitochondrial	
Fvar04549-1.2	<b>cytochrome P450 314A 1 spook</b>	
Fvar01695-1.2	cytochrome P450 315a1, mitochondrial	
GST	<b>Fvar13088-1.2</b>	<b>glutathione S-transferase S1</b>
	Fvar13088-1.2	glutathione S-transferase S2
	<b>Fvar07860-1.2</b>	<b>glutathione S-transferase S4</b>
	Fvar11895-1.2	glutathione S-transferase D1
	Fvar05549-1.2	pyrimidodiazepine synthase x1
	Fvar07143-1.2	glutathione S-transferase theta-1
	Fvar04946-1.2	probable maleylacetoacetate isomerase 2
	Fvar10229-1.2	microsomal glutathione S-transferase 1
	Fvar02266-1.2	microsomal glutathione S-transferase 2 (uncharacterized)
	Fvar01371-1.2	glutathione S-transferase E1
	Fvar06400-1.2	glutathione S-transferase 1
	Fvar04946-1.2	glutathione S-transferase Z2
Fvar06661-1.2	glutathione S-transferase omega-1	

(Continua...)

Categoria	Fvar Gene ID	Nome do gene
Antioxidante	<b>Fvar07326-1.2</b>	<b>superoxide dismutase 2, mitochondrial</b>
	Fvar10158-1.2	superoxide dismutase 1
	Fvar13963-1.2	RSOD
	Fvar04593-1.2	copper chaperone for superoxide dismutase
	Fvar13963-1.2	uncharacterized (partial)
	<b>Fvar01451-1.2</b>	<b>catalase</b>
	Fvar05186-1.2	glutathione peroxidase-like 1
	Fvar05597-1.2	probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
	Fvar13959-1.2	peroxiredoxin 1
	Fvar02659-1.2	thioredoxin peroxidase 3
	Fvar00207-1.2	thioredoxin peroxidase 4
	Fvar08567-1.2	peroxiredoxin-6
	Fvar09084-1.2	thioredoxin reductase 1
	Fvar14154-1.2	thioredoxin, mitochondrial
	Fvar00022-1.2	thioredoxin-2
	Fvar01432-1.2	thioredoxin-like protein 1
	Fvar09366-1.2	HPX-1-FRAG
	Fvar02671-1.2	HPX-6
	Fvar06405-1.2	Laccase-1-like
	Fvar00427-1.2	uncharacterized
	Fvar05043-1.2	endoplasmic reticulum resident protein 44
	Fvar09821-1.2	glutaredoxin-C4
	Fvar13633-1.2	glutaredoxin-related protein 5, mitochondrial
	Fvar03703-1.2	glutaredoxin 3
	Fvar10866-1.2	methionine sulphoxide reductase A
	Fvar06172-1.2	methionine-R-sulfoxide reductase B1
Imune/Defesa	<b>Fvar11817-1.2</b>	<b>dorsal X1</b>
	<b>Fvar03195-1.2</b>	<b>relish</b>
	Fvar12542-1.2	SPZ5
	Fvar12802-1.2	SPZ3
	Fvar03150-1.2	hymenoptaecin
	Fvar05787-1.2	HOME
	Fvar01479-1.2	SPZ1B
	Fvar09614-1.2	SPZ4
	Fvar06160-1.2	apidaecin
	Fvar08070-1.2	TOLL1
	Fvar08682-1.2	STAT
	Fvar08852-1.2	defensin 1
	Fvar11132-1.2	abaecin
	<b>Fvar03482-1.2</b>	<b>hsp90</b>
	Desenvolvimento	<b>Fvar09909-1.2</b>
Fvar01850-1.2		TCTP1 (putative reference gene)
<b>Fvar00764-1.2</b>		<b>RPL 32 (putative reference gene)</b>
<b>Fvar03548-1.2</b>		<b>EF1A (putative reference gene)</b>
Fvar10176-1.2		hexamerina 110
Fvar11973-1.2		hexamerina 70 (a/b?)
Fvar05113-1.2		hsc70-5
Fvar12564-1.2		DNA (cytosine-5) methyltransferase 3 (dmnt3)
Fvar11800-1.2		nuclear receptor HR3
Fvar06282-1.2		epidermal growth factor receptor (EGFR)
Fvar13774-1.2		ultraspiracle (USP)
Fvar13766-1.2		myosin heavy chain
Fvar04762-1.2		myosin regulatory light chain
Fvar09175-1.2		peritrophin P3 analogous
Fvar09960-1.2		yellow-y precursor
Fvar09254-1.2		period (Per)
Fvar13074-1.2		cycle (Cyc)
Fvar08364-1.2		kruppel homolog 1 (Kr-h1)
Fvar13674-1.2		calponin (chd64)
Fvar13973-1.2		ecdysone-induced protein 75 (E75)
Fvar06562-1.2		DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 b (DNMT1b)
Fvar07404-1.2		chico
Fvar03416-1.2		foxo
Fvar05922-1.2		DOR
Fvar12003-1.2		insulin growth factor (IGF)
<b>Fvar10799-1.2</b>		<b>vitellogenin (vg)</b>
Fvar10730-1.2		germ cell-expressed Protein (GCE)