

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**GABRIELA HELENA DE BARRIOS**

**A PARTICIPAÇÃO DE *MINIBRAIN* NO DESENVOLVIMENTO DIFERENCIAL DO  
CÉREBRO ADULTO EM CASTAS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA***

**ALFENAS/MG**

**2024**

**GABRIELA HELENA DE BARRIOS**

**A PARTICIPAÇÃO DE *MINIBRAIN* NO DESENVOLVIMENTO DIFERENCIAL DO  
CÉREBRO ADULTO EM CASTAS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

**ALFENAS/MG  
2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Barrios, Gabriela Helena de.

A participação de minibrain no desenvolvimento diferencial do cérebro adulto em castas de abelhas *Apis mellifera* / Gabriela Helena de Barrios. - Alfenas, MG, 2024.

59 f. : il. -

Orientador(a): Angel Roberto Barchuk.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. *A. mellifera*. 2. Neurogênese. 3. Minibrain. 4. Pupa. 5. RNAi. I. Barchuk, Angel Roberto, orient. II. Título.

GABRIELA HELENA DE BARRIOS

A PARTICIPAÇÃO DE *MINIBRAIN* NO DESENVOLVIMENTO DIFERENCIAL DO CÉREBRO ADULTO EM CASTAS DE ABELHAS  
APIS MELLIFERA

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 26 de Abril de 2024.

Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Anete Pedro Lourenço

Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UFVJM

Profa. Dra. Lívia Maria Rosatto Moda

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Angel Roberto Barchuk, Professor do Magistério Superior**, em 26/04/2024, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1240138** e o código CRC **A81C63F9**.

Aos meus pais, Ademir e Lenice,  
A minha, tia Cláudia,  
A minha prima, Giovana,  
Aos meus amigos, Isabella, Lucas e Adriano,  
Ao meu amor e porto seguro, Eduardo...

## AGRADECIMENTOS

Sou grata pela vida e pelos caminhos percorridos para chegar até aqui, agora compreendo que não poderia ter sido diferente.

Assim como faço diariamente, agradeço a Deus e ao Universo por todas as novas oportunidades que nascem junto com o sol, por todo amor dado e recebido, por toda resiliência e ensinamentos.

Serei eternamente grata a todos que possibilitaram meu voo e que sempre foram ninho quando precisei. Agradeço meus pais, Ademir de Barrios e Lenice Olimpio, por sempre encorajarem meus sonhos, mesmo sem entendê-los às vezes; minhas tias e eternas professoras, Cláudia e Eunice Barrios, por sempre terem defendido a educação e incentivado meus estudos desde cedo; meus avós, familiares e amigos que fizeram parte dessa trajetória.

Agradeço de coração todos os professores que tive ao longo da vida e deixo aqui um muito obrigada especial àqueles que foram responsáveis por minha formação na pós-graduação, sobretudo meu orientador Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, por tornar possível a realização deste trabalho e por toda paciência ao longo desses anos de parceria.

Sou grata a toda rede de apoio que me acompanhou nessa jornada, meus amigos do peito, Isabella Fontaniello, Lucas Gavião, Adriano Israel e Helena Gianini; minha parceira de pesquisa, laboratório, apiário e família em Alfenas, Raissa Bayker, sem ela nada disso existiria; meu amor, parceiro de vida e porto seguro, Eduardo Jacob, com ele tudo se torna possível, mais leve e divertido; meus alunos, que todos os dias me permitem ensinar e também aprender, existe um pouquinho de cada um deles em mim.

Agradeço imensamente toda a equipe do LABAInt e LaBMi, com menção honrosa a Profa. Dra. Talita Sarah Mazzoni e a técnica de laboratório Dra. Juliana Martins Ramos, por terem me ajudado nos momentos mais delicados do meu trabalho, pelas conversas, dicas de experimentos e ensinamentos, tornando-se pessoas chaves para a concretização deste trabalho; aos integrantes do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade, em especial a Profa. Dra. Lívia Moda, pela troca de experiência, dicas e momentos de descontração.

Não poderia deixar de agradecer à UNIFAL-MG – *campus* Alfenas como um todo, por todas as trocas e experiências proporcionadas, ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF), que tornou possível a realização desse sonho, a coordenadora do programa Profa. Dra. Roseli Soncini, por sempre ser solícita e empática com os alunos, e a secretária do PPGMCF Adriana Pereira, por sempre me acolher e auxiliar desde o princípio.

Por fim, agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida nestes dois anos, sem o financiamento esse trabalho não aconteceria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“MULTITUD de la abeja!  
Entra y sale  
del carmín, del azul,  
del amarillo,  
de la más suave  
suavidad del mundo:  
entra en  
una corola  
precipitadamente,  
por negocios,  
sale  
con traje de oro  
y cantidad de botas  
amarillas...”*

**ODA A LA ABEJA**  
(Pablo Neruda, 1957)

## RESUMO

Em colônias de abelhas *Apis mellifera*, existem dois tipos de fêmeas (castas), rainhas (reprodutivas) e operárias (não-reprodutivas). A trajetória ontogenética que conduz ao surgimento de rainhas e operárias depende da quantidade e da qualidade da dieta recebida durante o desenvolvimento larval. Esta influência ambiental permite o desenvolvimento de características casta-específicas que incluem morfologia, fisiologia e comportamento. O cérebro de abelhas operárias adultas é proporcionalmente maior que o de rainhas, o que permite que as operárias realizem uma gama de atividades necessárias para manter o bem-estar da colônia. Em contrapartida, a neurogênese pós-embriônica em *A. mellifera* inicia-se logo na fase larval e sofre influência da nutrição diferencial que recebem as fêmeas, resultando em rainhas com cérebros maiores. Análises morfológicas mostram que essa inversão na tendência morfogenética acontece após a metamorfose. Análises transcriptômicas em larga escala utilizando hibridação de *microarray* de oligonucleotídeos revelaram maiores níveis de transcrição no cérebro de pupas de operárias de 324 genes, entre eles, *minibrain (mnb)*. O presente trabalho objetivou avaliar a participação do gene *mnb* no desenvolvimento diferencial do cérebro adulto entre rainhas e operárias de abelhas *A. mellifera*. O primeiro passo foi obter abelhas operárias em desenvolvimento pupal *knockdown* para *mnb*, executando experimentos sequenciais de RNAi (*knockdown*, KD). Foram realizados três experimentos, cada um com 150 pupas, divididas em 3-4 grupos experimentais: pupas que receberam injeções de dsMNB, injeções dsGFP, injeções de NaCl 0,9% e pupas naive. Após um período de tratamento, foram realizadas análises moleculares para avaliar os indicadores de *knockdown* de *mnb* e avaliar o fenótipo morfológico dos cérebros. Os resultados obtidos com qPCR mostraram ocorrência de *knockdown de mnb* e nos possibilitou também analisar o *timing* do silenciamento deste gene. Os ensaios histológicos mostraram o efeito do *knockdown* sobre o desenvolvimento do cérebro adulto, que ficou evidenciado pelas menores dimensões apresentadas por regiões cerebrais como corpo cogumelar, lobos ópticos e cérebro ( $p < 0,05$ ). Estes resultados indicam que o *mnb* tem um papel chave no desenvolvimento do cérebro de operárias durante o período pupal e confirmam sua participação no desenvolvimento diferencial de castas de *A. mellifera*.

**Palavras-chave:** *A. mellifera*; Neurogênese; *Minibrain*; Pupa; RNAi

## ABSTRACT

In colonies of *Apis mellifera* bees, there are two types of females (castes), queens (reproductive) and workers (non-reproductive). The ontogenetic trajectory leading to the emergence of queens and workers depends on the quantity and quality of the diet received during larval development. This environmental influence allows the development of caste-specific characteristics, including morphology, physiology, and behavior. The adult worker bee's brain is proportionally larger than that of queens, enabling workers to perform a range of activities necessary for maintaining colony well-being. Conversely, post-embryonic neurogenesis in *A. mellifera* begins early in the larval stage and is influenced by the differential nutrition received by females, resulting in queens having larger brains. Morphological analyses show that this reversal in morphogenetic tendency occurs after metamorphosis. Large-scale transcriptomic analyses using oligonucleotide *microarray* hybridization revealed higher transcription levels in the brains of worker pupae for 324 genes, including *minibrain* (*mnb*). This study aimed to assess the involvement of the *mnb* gene in the differential development of adult brains between queens and worker bees of *A. mellifera*. The first step was obtaining developing worker bees in the pupal stage with *mnb* knockdown, carrying out sequential RNAi (*knockdown*) experiments. Three sequential experiments were conducted, each with 150 pupae divided into 3-4 experimental groups: pupae that received injections of dsMNB, dsGFP injections, 0.9% NaCl injections, and naive pupae. After a treatment period, molecular analyses were performed to assess *mnb* knockdown indicators and evaluate the morphological phenotype of the brains. The qPCR results showed *mnb* knockdown occurrence and enabled us to analyze the timing of gene silencing. Histological tests showed the effect of knockdown on the development of the adult brain, which was evidenced by the smaller dimensions presented by brain regions such as the mushroom body, optic lobes, and brain ( $p < 0,05$ ). These results indicate that *mnb* plays a key role in the development of the brain of workers during the pupal period and confirm its participation in the differential development of *A. mellifera* castes.

**Keywords:** *A. mellifera*; Neurogenesis; *Minibrain*; Pupa; RNAi

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema proposto para explicar o processo de morfogênese cerebral diferencial em castas de <i>Apis mellífera</i> .....	23
Figura 2 –	Perfil de transcrição casta-específico de <i>mnb</i> durante o desenvolvimento do cérebro adulto de <i>Apis mellifera</i> .....	24
Figura 3 –	Obtenção de quadro do Apiário Experimental.....	27
Figura 4 –	Resumo do desenho experimental utilizado para o Experimento I.....	28
Figura 5 –	Resumo do desenho experimental utilizado para o Experimento II .....	29
Figura 6 –	Resumo do desenho experimental utilizado para o Experimento III.....	30
Figura 7 –	Suporte em madeira no qual era encaixado o quadro retirado da colmeia para observação em laboratório. Permite que os usuários desoperquem os alvéolos e retirem as abelhas nas fases de desenvolvimento desejado .....	31
Figura 8 –	Características fenotípicas externas de pupas de operárias <i>Apis mellifera</i> ao longo de seu desenvolvimento .....	31
Figura 9 –	Ilustração da aplicação das injeções da solução de dsRNA na região entre ocelos de operárias <i>Apis mellifera</i> em desenvolvimento, destacada na figura.	33
Figura 10 –	Amostra sendo seccionada através de corte histológico seriado .....	38
Figura 12 –	Esquema representativo das regiões cerebrais da abelha, salientando as utilizadas para a morfometria e cálculo do volume .....	44
Figura 13 –	Corte histológico longitudinal do cérebro de abelha .....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Resultado da qPCR comparando a expressão de minibrain nos grupos que receberam injeções dsGFP, dsMNB e controle (s/injeção) ..... 40
- Gráfico 2 – Resultado da qPCR comparando expressão de minibrain nos grupos que receberam injeções dsGFP, dsMNB e controle (s/injeção) ..... 42
- Gráfico 3 – Resultado da qPCR comparando expressão de minibrain nos grupos que receberam injeção de dsGFP, dsMNB, controle salina 0,9% e controle naive (s/injeção)..... 43
- Gráfico 4 – Representação gráfica da média e do desvio padrão dos volumes das diferentes regiões cerebrais em indivíduos do grupo controle (n=5) e do grupo tratado (n=5) em microlitros ( $\mu$ l) ..... 46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características utilizadas para classificar o desenvolvimento pós-larval de operárias e rainhas de <i>Apis mellifera</i> africanizadas.....	32
Tabela 2 –	Características dos primers usados nos ensaios de PCR.....	36

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	GENES E AMBIENTE: OS POLIFENISMOS EM INSETOS.....	15
1.2	CASTAS E DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS EM ABELHAS <i>APIS MELLIFERA</i> .....	15
1.3	A SAGA ONTOGENÉTICA DO CÉREBRO EM CASTAS DE ABELHAS <i>APIS MELLIFERA</i> .....	18
1.4	EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL E O DESENVOLVIMENTO DO CÉREBRO ADULTO EM CASTAS DE <i>APIS MELLIFERA</i> .....	19
1.5	O GENE <i>MINIBRAIN (MNB)</i> .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>27</b>
3.1	VISÃO GERAL E LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA .....	27
3.2	PROTOCOLO PARA <i>KNOCK-DOWN</i> DE <i>MINIBRAIN</i> POR RNAi.....	30
3.2.1	Obtenção de pupas .....	30
3.2.2	Obtenção de dsRNAs e injeção em pupas.....	32
3.2.3	Dissecção de cérebros .....	33
3.2.4	Extração de RNA total .....	34
3.2.5	Análise por RT-qPCR em tempo real .....	35
3.3	ANÁLISES HISTOLÓGICAS .....	<b>36</b>
3.3.1	Preparação Histológica.....	36
3.3.2	Preparação do Material para Microscopia de Luz.....	37
3.3.3	Morfometria .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	EXPERIMENTO #1 .....	39
4.2	EXPERIMENTO #2.....	42
4.3	EXPERIMENTO #3.....	42
4.4	ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS CÉREBROS DE ABELHAS <i>APIS MELLIFERA</i> .....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
	<b>ANEXO A - Sequência do mRNA de <i>mnb</i> mostrando o fragmento de 543 nt utilizado nos ensaios de RNAi (entre as sequências de <i>primers</i>, sublinhadas) (A) e sequência de aminoácidos mostrando o domínio PK (proteína-quinase) incluído no fragmento (B).....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 GENES E AMBIENTE: OS POLIFENISMOS EM INSETOS

A plasticidade fenotípica, conforme proposto por Nijhout (1999), destaca que um único genótipo pode originar fenótipos alternativos, dependendo das variações ambientais enfrentadas pelo organismo durante seu desenvolvimento. Esse fenômeno é exemplificado pelo polifenismo, uma forma particular de plasticidade, que se caracteriza pela habilidade dos organismos, compartilhando o mesmo genoma, de se desenvolverem de maneira distintiva em dois ou mais fenótipos alternativos, sem apresentar formas intermediárias, conforme delineado por Mayr (1963).

Em insetos, é frequente observar a manifestação de morfologias alternativas acompanhadas por diferenças fisiológicas e comportamentais. A presença de tipos morfofisiológicos distintos dentro de uma mesma espécie, que podem se complementar, desempenhando funções diversas e beneficiando-se mutuamente, associada à sobreposição de gerações, caracteriza o grupo dos insetos eussociais. A organização colonial desses insetos é fundamentada na divisão de trabalho, conforme proposto por Wilson (1971). Nas espécies eussociais, como formigas, vespas, abelhas e cupins (Ordem Blattodea), algumas colônias possuem membros parcial ou totalmente estéreis (operárias), enquanto outros (rainhas) apresentam um sistema reprodutivo hipertrofiado, exibindo taxas de reprodução significativamente elevadas (Nijhout, 1982; Wilson, 1971).

No contexto dessa divisão de trabalho, a rainha fisogástrica (fecundada) desempenha um papel crucial na promoção da oviposição, que resultará na geração de novos membros para a colônia. Por sua vez, as operárias desempenham atividades que incluem o cuidado das crias, a limpeza da colônia e o forrageamento. Esse arranjo social, baseado na segregação de castas, é uma característica distintiva desses insetos eussociais.

### 1.2 CASTAS E DIFERENCIAÇÃO DE CASTAS EM ABELHAS *APIS MELLIFERA*

A espécie *Apis mellifera* é classicamente conhecida por sua organização altamente eussocial. A definição de eussocialidade inclui divisão do trabalho reprodutivo entre indivíduos, específicos de cada casta, o cuidado cooperativo da prole e a sobreposição de gerações (Gullan; Cranston, 1994; Wilson, 1971). O dimorfismo de castas, presença de rainha e operárias, também

existe nas abelhas *A. mellifera* e na organização social destas abelhas existem três tipos de indivíduos adultos: operárias, rainhas e zangões. O dimorfismo de fêmeas constitui a característica que define o grau máximo de organização social, alta eussocialidade (Wilson, 1971).

A diferenciação das castas, rainhas e operárias, na espécie, está intrinsecamente ligada ao tipo de alimentação recebida durante o período larval, visto que todas as larvas possuem a capacidade genômica de se diferenciar em ambas as castas (Beetsma, 1979). Desde a eclosão dos ovos até aproximadamente o terceiro ínstar, todas as larvas fêmeas são bipotentes e alimentadas exclusivamente com geleia real. A partir desse ponto, a alimentação torna-se específica para cada casta, de modo que as larvas destinadas a se tornarem rainhas continuam a receber quantidades substanciais de geleia real. Em contrapartida, as larvas selecionadas para se tornarem operárias passam a receber uma combinação de geleia real, mel e pólen, denominada geleia de operárias (Michener, 1969).

A composição bioquímica desses dois tipos de alimentos é notavelmente distinta. A geleia real apresenta uma concentração de carboidratos cerca de três vezes maior do que a geleia de operárias, além de uma quantidade reduzida de ácidos ribonucleicos de cadeia curta (miRNAs), e variações na composição proteica. Adicionalmente, há diferenças significativas na quantidade de alimento fornecido às larvas. As larvas destinadas a se tornarem rainhas recebem quantidades consideravelmente maiores de alimento em comparação com aquelas destinadas à casta operária (Corona; Estrada; Zurita, 1999; Kamakura, 2011; Zhu *et al.*, 2017).

Em *A. mellifera*, a diferenciação alimentar desencadeia respostas neuroendócrinas notáveis, refletidas em variações nos níveis de um hormônio específico produzido pelas glândulas no complexo retrocerebral, conhecidas como *corpora allata*, chamado hormônio juvenil (Nijhout; Wheeler, 1982). É estabelecido que, entre o terceiro e o início do quinto estágio larval, as concentrações do hormônio juvenil (HJ) são significativamente mais elevadas nas rainhas em comparação com as operárias. O HJ figura como um dos fatores endógenos clássicos e essenciais que determinam o desenvolvimento de castas em *A. mellifera* (Rachinsky *et al.*, 1990). Contudo, diversos aspectos do processo de determinação de castas nessas abelhas ainda permanecem pouco elucidados, especialmente no que se refere aos determinantes genéticos da diferenciação entre rainhas e operárias.

Com o advento de técnicas avançadas de biologia molecular foi possível em 2006 sequenciar o genoma de *A. mellifera*, o que alavancou as pesquisas que objetivavam descobrir os determinantes moleculares da diferenciação de castas na espécie. Posteriormente, Barchuk

*et al.* (2007) sugeriram que a informação nutricional é reconhecida por receptores presentes nas células epiteliais do intestino que, por meio do sistema nervoso estomatógástrico, é transmitida ao cérebro e ao sistema endócrino retrocerebral, o que resulta na regulação da atividade dos *corpora allata*. De forma geral, a informação nutricional provinda da geleia real leva à ativação da via insulina/IGF e do sistema Tor, que, em conjunto, são capazes de promover altos níveis de síntese de HJ levando ao desenvolvimento de rainhas.

Com o incremento nos níveis de hormônio juvenil (HJ), ocorrem modificações na expressão de diversos genes, incluindo aqueles com características fisiometabólicas. Estes, aliados aos nutrientes presentes na geleia real, desempenham um papel crucial na determinação do padrão de crescimento corporal. O hormônio juvenil parece influenciar o desenvolvimento de duas maneiras distintas. Primeiramente, induz alterações de aquisição, que resultam em um aumento significativo no crescimento corporal da larva, assim como em campos específicos, como os ovários. Em segundo lugar, provoca alterações de perda em estruturas específicas, tais como o órgão coletor de pólen e as glândulas de cera.

Além disso, o hormônio juvenil demonstra exercer controle sobre o desenvolvimento neural nas larvas, promovendo um desenvolvimento cerebral mais proeminente em rainhas quando comparado a operárias. Isso destaca a importância fundamental do padrão alimentar das larvas na formação do sistema nervoso (Barchuk *et al.*, 2007; Moda *et al.*, 2013).

Embora a alimentação seja tradicionalmente considerada uma fonte clássica de energia e matéria-prima para a construção de biomoléculas essenciais no desenvolvimento e na sobrevivência dos seres vivos, evidências recentes destacam papéis mais específicos desse aspecto alimentar. Um exemplo notável é sua capacidade de exercer influência direta sobre a neurogênese. Pesquisas com roedores indicam que a redução na ingestão calórica aumenta a neurogênese hipocampal, provocando alterações na expressão gênica nessa região. Essa modificação está associada ao aumento da produção de fatores neurotróficos, responsáveis pela proliferação e diferenciação neural no hipocampo (Lee; Seroogy; Mattson, 2002).

Seguindo essa linha de raciocínio, Park *et al.* (2010) observaram que dietas ricas em gorduras prejudicam a proliferação de células progenitoras neurais, devido ao aumento da peroxidação lipídica e à diminuição do fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo de ratos. Esse fenômeno está associado a disfunções cognitivas, comprometendo aprendizado e memória. As vitaminas, também componentes cruciais da dieta, mostram-se fundamentais para a neurogênese. Em animais submetidos a dietas deficientes em vitamina E, observam-se alterações na atividade de genes, incluindo aqueles responsáveis pela produção de mielina, um

lipídeo essencial para a neurotransmissão (Hyland *et al.*, 2006). Além disso, a deficiência de vitamina A em roedores demonstrou ser capaz de desregular a neurogênese hipocampal (Bonnetti *et al.*, 2008).

Em *Apis mellifera*, evidências indicam que a alimentação desempenha um papel crucial na morfogênese do sistema nervoso. O padrão alimentar distinto da espécie, durante os estágios iniciais do desenvolvimento, representa essencialmente um experimento natural. Esse experimento natural, por sua vez, oferece uma valiosa oportunidade para a identificação de cascatas gênicas que são influenciadas nutricionalmente e desempenham um papel no intrincado processo de desenvolvimento do sistema nervoso, conforme demonstrado em estudo conduzido por Moda *et al.* (2013).

### 1.3 A SAGA ONTOGENÉTICA DO CÉREBRO EM CASTAS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA*

Assim como os ovários, o cérebro apresenta desenvolvimento casta-específico durante o período larval. Em resposta à alimentação diferencial, o cérebro de rainhas se desenvolve de maneira mais acelerada (Moda *et al.*, 2013). O período larval é caracterizado por um maior desenvolvimento cerebral e uma heterocronia, ambos favorecendo às rainhas.

Apesar de terem arquitetura semelhante, o cérebro das castas de *A. mellifera* apresenta um desenvolvimento heterocrônico. Roat e Cruz-Landim (2008) mostraram que o cérebro de rainhas possui maior área de neuroblastos em relação ao cérebro de operárias durante o último estágio larval. As taxas de proliferação celular no cérebro também favorecem às rainhas, que entre o quarto e o quinto ínstar larval demonstram ter maior número de células em processo de divisão celular (Moda *et al.*, 2013). O maior número de neuroblastos e as maiores taxas proliferativas favorecem o desenvolvimento do cérebro de rainhas e estabelecem a assincronia em relação à neurogênese em operárias.

A inversão das proporções do cérebro entre rainhas e operárias acontece durante o desenvolvimento pupal (Barchuk *et al.*, 2018; Groh; Rossler, 2008; Paula Junior *et al.*, 2021), possibilitando que o cérebro de abelhas operárias adultas seja proporcionalmente maior que o de rainhas. Durante a primeira parte do período de desenvolvimento farato-adulto, as operárias desenvolvem cérebros maiores do que as rainhas, possivelmente em resposta às diferenças nos ambientes hormonais entre as castas (Paula Junior *et al.*, 2021). Isto permite que as operárias realizem uma gama de atividades necessárias para manter o bem-estar da colônia (Michener,

1974).

#### 1.4 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL E O DESENVOLVIMENTO DO CÉREBRO ADULTO EM CASTAS DE *APIS MELLIFERA*

Em *A. mellifera*, o desenvolvimento do cérebro tem origem na ectoderme da região cefálica embrionária, enquanto os gânglios corporais são derivados do cume da neuroectoderme (Snodgrass, 1984). O sistema nervoso das abelhas é constituído pelo cérebro, localizado acima do gânglio subesofágico, juntamente com um cordão ventral extenso, três gânglios no tórax e oito no abdômen (Niven; Graham; Burrows, 2008).

O cérebro de *A. mellifera* e de outros insetos pode ser segmentado em duas regiões distintas: uma supraesofágica, abrigando o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro, e uma porção subesofágica (Howse, 1975). O protocérebro compreende os lóbulos ópticos, o complexo central e um par de corpos cogumelares. Os lóbulos ópticos desempenham a função de receber e processar informações sensoriais provenientes dos olhos compostos. O complexo central atua na conexão e coordenação de informações dos hemisférios cerebrais, sendo supostamente envolvido no controle motor (Brandt *et al.*, 2005; Strauss, 2002). Os corpos cogumelares, situados simetricamente em cada lado do protocérebro, funcionam como centros de processamento neural e armazenamento de informações sensoriais (Farris; Dyke, 2015).

O deutocérebro é a sede dos lóbulos dorsais e antenais, os quais abrigam cerca de 160 glomérulos, responsáveis por receber informações sensoriais dos receptores olfativos nas antenas. A partir dos lóbulos dorsais, em especial, são projetadas as fibras mecanossensoriais (Snodgrass, 1984; Suzuki, 1975;). O tritocérebro é composto por dois lóbulos laterais relativamente pequenos, localizados na base do cérebro. Esses lóbulos são conhecidos por suas conexões sensoriais e motoras com o aparelho bucal e o trato digestivo, estando em proximidade ao gânglio subesofágico, um ponto de transição entre o cérebro e o cordão nervoso ventral (Mobbs, 1982).

O protocérebro abriga os lóbulos ópticos, o complexo central e um par de corpos cogumelares. Os lóbulos ópticos recebem e processam informações sensoriais provenientes dos olhos compostos. Os lóbulos antenais, posicionados ventralmente aos lóbulos do protocérebro, formam o sistema responsável pela percepção de estímulos químicos. As principais saídas dos lóbulos antenais para o cérebro central ocorrem por meio de neurônios de projeção, direcionando-se aos corpos cogumelares e a um subcompartimento específico do protocérebro,

conhecido como corno lateral (Brandt *et al.*, 2005).

O complexo central desempenha um papel crucial na coordenação e conexão de informações provenientes de ambos os hemisférios cerebrais, estando presumivelmente envolvido no controle motor. Esta estrutura é composta por um conjunto de neurópilas situado no centro do cérebro, abrangendo a ponte protocerebral e o corpo central. O corpo central, por sua vez, é subdividido em segmentos superior e inferior, além de um par de nódulos (Strauss, 2002).

Os corpos cogumelares representam estruturas emparelhadas, situadas de maneira simétrica em ambos os lados do protocérebro, identificadas como o epicentro neural essencial para o processamento e armazenamento de informações olfativas (Davis, 2001; Gerber; Tanimoto; Heisenberg, 2004). Essas estruturas também estão implicadas em outras formas de aprendizado (Liu *et al.*, 1999; Mizunami; Weibrecht; Strausfeld, 1993). Cada corpo cogumelar é composto por aproximadamente 170.000 células Kenyon, que constituem neurônios intrínsecos dessa configuração (Kenyon, 1896). Suas ramificações dendríticas originam neurópilas dispostas concentricamente, formando os cálices medial e lateral. Cada cálice se subdivide em três subcompartimentos: o lábio, responsável pelo recebimento de informações olfativas; o colar, que recebe informações visuais; e o anel basal em camadas, onde as entradas visuais e olfativas convergem (Rybak; Menzel, 1998; Strausfeld, 2002). As projeções axonais das células de Kenyon originárias dos cálices formam o pedúnculo, bem como os lobos vertical e medial dos corpos cogumelares (Strausfeld, 2002).

Embora compartilhem uma arquitetura semelhante, observa-se um desenvolvimento heterocrônico no cérebro das diferentes castas de *A. mellifera*. A pesquisa conduzida por Roat e Cruz-Landim (2008) indicou que, durante o estágio larval final, o cérebro das rainhas exibe uma maior área de neuroblastos em comparação com o cérebro das operárias. As taxas de proliferação celular no cérebro também favorecem a casta reprodutora, destacando-se entre o quarto e o quinto ínstar larval com um aumento significativo no número de células em processo de divisão celular (Moda *et al.*, 2013). A presença ampliada de neuroblastos e as taxas mais elevadas de proliferação celular promovem o desenvolvimento diferenciado do cérebro das rainhas, estabelecendo, assim, uma assincronia em relação à neurogênese nas operárias.

Em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa, empregando técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real, hibridação *in situ*, ensaios de proliferação celular e técnicas imunohistoquímicas, foi investigada a neurogênese larval nas castas de *A. mellifera*. O trabalho conduzido por Moda *et al.* (2013) revelou que a expressão do

gene short stop (shot) desempenha um papel crucial na neurogênese diferencial em larvas, favorecendo o desenvolvimento futuro das rainhas. Esse gene desempenha uma função significativa na extensão de axônios e é mais expresso em rainhas no quarto ínstar larval, o que pode explicar a presença de uma área maior ocupada por neuroblastos nas rainhas durante os estágios finais do desenvolvimento larval.

Outro gene examinado no estudo foi o GlcAT-P (glucoroniltransferase-P), cuja expressão é mais proeminente nos cérebros das rainhas ao longo de todo o período larval. Já foi demonstrado que esse gene é essencial para o desenvolvimento de nervos periféricos em *Drosophila melanogaster* e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico em roedores. Assim, postula-se que shot e o GlcAT-P, atuando em conjunto, desempenham uma função crucial no desenvolvimento do cérebro das rainhas na fase larval.

Este estudo evidenciou que a expressão diferencial de genes específicos gera uma dinâmica distinta no desenvolvimento cerebral entre rainhas e operárias. Ao longo do período larval, o cérebro das rainhas apresenta um desenvolvimento mais rápido e acentuado, dando origem a estruturas cerebrais como cálices e pedúnculos que surgem mais precocemente em larvas de rainhas em comparação com larvas de operárias (Moda *et al.*, 2013).

Durante o período pupal e a fase adulta-farato das castas de *A. mellifera*, há ainda uma lacuna no entendimento da dinâmica de desenvolvimento do cérebro. No entanto, é amplamente reconhecido que o cérebro das operárias adultas é proporcionalmente maior do que o das rainhas (Michener, 1974). Por volta da metade do período pupal/adulto-farato, observa-se o término da proliferação de neuroblastos e o início de eventos apoptóticos, coincidindo com o aumento dos níveis de ecdisteroides (Ganeshina *et al.*, 2000; Hartfelder; Engels, 1998;). Ambos os eventos parecem responder ao mesmo sinal hormonal, sendo sugerido que as proteínas retinoblastoma e p53 participem da progressão do ciclo celular (Ganeshina *et al.*, 2000).

Além disso, estudos indicaram que a exposição precoce de pupas ao hormônio 20-hidroxiecdisona, de forma exógena, resulta na redução da atividade mitótica nos centros de proliferação dos corpos cogumelares das abelhas. Marcadores celulares também evidenciaram a antecipação da morte celular no cérebro das pupas durante o pico dos hormônios ecdisteroides (Ganeshina *et al.*, 2000; Malun; Moseleit; Grunewald, 2003). Coletivamente, esses resultados sugerem a existência de uma cascata de reações influenciada pelo ambiente hormonal característico do período de desenvolvimento pupal/adulto-farato. Essa cascata de reações, por sua vez, parece desempenhar um papel crucial na morfogênese diferencial do cérebro adulto

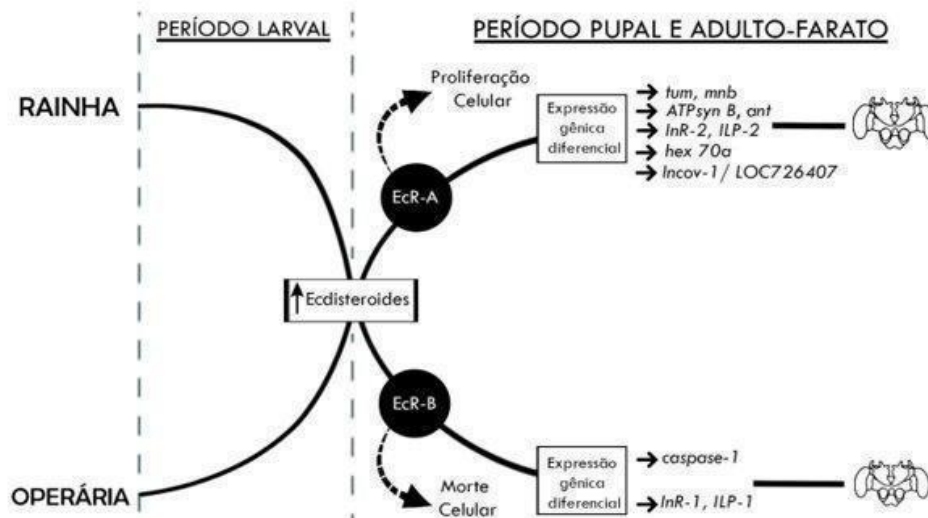
entre rainhas e operárias, contribuindo para a geração de padrões específicos de expressão gênica associados às diferentes castas.

Dessa maneira, os resultados obtidos por meio da hibridação de lâminas de *microarrays* de oligonucleotídeos com amostras de ácido ribonucleico (RNA) provenientes de cérebros de pupas de operárias e rainhas revelaram que a morfogênese diferencial está associada à expressão diferencial de um conjunto de genes positivamente regulados nos cérebros de operárias. Esses genes podem estar diretamente ligados ao processo de morfogênese cerebral diferencial na espécie, conforme evidenciado por Oliveira (2014).

Existem evidências de que o cérebro da rainha experimenta taxas relativamente maiores de morte celular durante o desenvolvimento pupal, enquanto a operária é favorecida por altas taxas de proliferação celular, resultando em cérebros adultos casta-específicos (Paula Junior *et al.*, 2021).

Análises de expressão gênica em larga escala utilizando hibridação de *microarrays* de oligonucleotídeos revelaram um padrão oposto ao observado durante o período larval, com maiores níveis de transcrição no cérebro de operárias de 324 genes (por exemplo, *mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor*, *minibrain*, *signal peptide peptidase* e *tumbleweed*, todos associados a eventos neurogênicos ou a prevenção da morte celular), sugerindo que de alguma forma os respectivos produtos dos genes promovam o desenvolvimento diferencial do cérebro de abelhas (Paula Junior *et al.*, 2021). Estes autores sugerem ainda a existência de um limiar ecdisteróides/receptor, que permite que altos títulos hormonais, em rainhas, desencadeiem mais eventos de morte celular do que eventos de proliferação, o que por meio da participação de genes efetores, acarretaria as diferenças morfológicas no cérebro adulto entre rainhas e operárias (Figura 1).

Figura 1 – Esquema proposto para explicar o processo de morfogênese cerebral diferencial em castas de *Apis melífera*



Fonte: Paula Junior *et al.*, 2021.

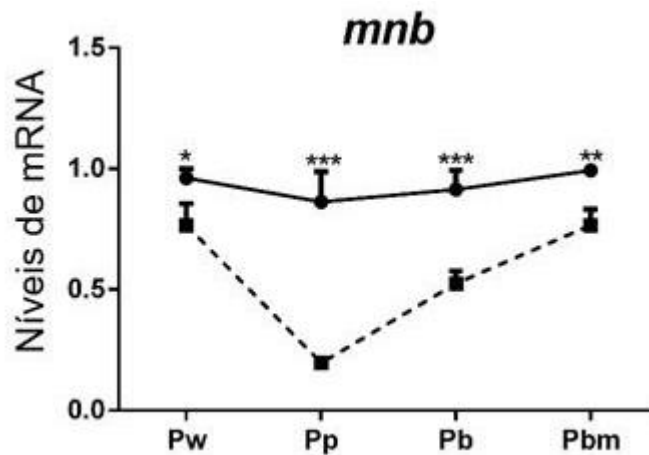
Em colônias de abelhas *A. mellifera*, existem dois tipos de fêmeas (castas), rainhas (reprodutivas) e operárias (não-reprodutivas). A trajetória ontogenética que conduz ao surgimento de rainhas e operárias depende da quantidade e da qualidade da dieta recebida durante o desenvolvimento larval. Esta influência ambiental permite o desenvolvimento de características casta-específicas que incluem morfologia, fisiologia e comportamento. O cérebro de abelhas operárias adultas é proporcionalmente maior que o de rainhas, o que permite que as operárias realizem uma gama de atividades necessárias para manter o bem-estar da colônia. Porém, a neurogênese pós-embriônica em *A. mellifera* inicia-se logo na fase larval e sofre influência da nutrição diferencial que recebem as fêmeas, resultando em rainhas com cérebros maiores. Análises morfológicas mostram que essa inversão na tendência morfogênética acontece após a metamorfose.

### 1.5. O GENE *MINIBRAIN* (*MNB*)

Entre os genes envolvidos no desenvolvimento diferencial do cérebro adulto de fêmeas de *A. mellifera* encontra-se *minibrain* (Paula Junior *et al.*, 2021). *Minibrain* (*mnb*) demonstrou ser mais expresso em cérebros de operárias durante todo o desenvolvimento pupal e adulto-farato. O cérebro de operárias apresentou maiores níveis de transcritos para esse gene em todas as quatro fases de desenvolvimento analisadas pelo autor, o que sugere sua participação na

definição do balanço proliferação/morte celular no cérebro das castas em desenvolvimento (Figura 2).

Figura 2 – Perfil de transcrição casta-específico de *mnb* durante o desenvolvimento do cérebro adulto de *Apis mellifera*



Fonte: Paula Junior *et al* (2021).

Legenda: A linha contínua representa a casta das operárias e a linha pontilhada representa a casta das rainhas.

Fases pupais - Pw: Pupa de olho branco, sem pigmentação na cutícula; Pp: Pupa de olho rosa, sem pigmentação na cutícula; Pb: Pupa de olho marrom, sem pigmentação na cutícula; Pbm: Pupa de olho marrom e com pigmentação intermediária na cutícula.

A proteína *minibrain*, também conhecida como DYKR1A, pertence à distinta família de tirosina quinases de especificidade dual (DYRK). Esta designação é atribuída em razão da notável capacidade dessas enzimas em fosforilar aminoácidos aromáticos (tirosina) e alifáticos (serina e treonina) simultaneamente (Soppa; Becker, 2015). As proteínas quinases (PKs) constituem um grupo extenso dentro do proteoma dos animais, sendo estimado que o genoma de mamíferos possa codificar para mais de mil PKs, conforme sugerido por Hunter em 1987. Em decorrência dessa notável diversidade, as PKs desempenham um papel essencial na modificação da atividade de seus substratos, exercendo influência sobre uma ampla gama de processos de transdução de sinal. Portanto, as PKs emergem como reguladoras críticas de inúmeras funções celulares, incluindo metabolismo, transcrição, rearranjo do citoesqueleto, apoptose, diferenciação, proliferação e ciclo celular (Mannig *et al.*, 2002).

Um das funções controladas pelas PKs, mais especificamente pela subfamília DYRK, refere-se ao desenvolvimento do sistema nervoso. Isso se deve à capacidade de membros dessa subfamília de interagir com substratos proteicos importantes para a função neural (Tejedor;

Hämmerle, 2011).

A primeira associação entre o gene *mnb* e a função neural foi reportada em 1995, data em que pesquisadores verificaram que, em *D. melanogaster*, mutações de perda de função neste gene geram sérios prejuízos ao desenvolvimento neural. Os animais mutantes exibiam espaçamento anormal de neuroblastos e redução no número de progenitores neurais. Sendo assim, exibiam comprometimento na neurogênese pós embrionária, o que culminou em animais adultos com redução no tamanho do cérebro (Tejedor *et al.*, 1995). Ensaios de hibridização *in situ* em camundongos revelaram também intensa expressão de *mnb* no tubo neural e vesícula ótica, sugerindo importante papel durante os estágios iniciais da neurogênese.

Por outro lado, há evidências de que *minibrain* possa exercer controle sobre a expressão gênica. Na cadeia polipeptídica da proteína existe uma sequência que sugere transporte e função nuclear. Essa região é composta por tetrâmeros de leucinas separados por heptâmeros de aspartato, e é característica de proteínas com capacidade de ligação ao DNA, como as proteínas c-Fos e c-Jun (Song, *et al.*, 1996).

Considerando seus maiores níveis de transcrição em cérebros de operárias em desenvolvimento (Paula Junior, *et al.*, 2021), **hipotetizou-se que o *mnb* promove maior proliferação de neuroblastos e maior sobrevivência neuronal no cérebro de operárias durante o desenvolvimento pupal e adulto-farato.** Esta ação poderia ser desenvolvida diretamente, ao exercer sua atividade quinase sobre substratos neurogênicos, e indiretamente, ao controlar a expressão de outros genes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação do gene *mnb* no desenvolvimento diferencial do cérebro adulto entre rainhas e operárias de abelhas *A. mellifera*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter abelhas operárias em desenvolvimento pupal *knockdown* para *mnb*;
- b) Avaliar parâmetros moleculares indicadores de *knockdown* de *mnb* em operárias em desenvolvimento pupal;
- c) Avaliar o fenótipo morfológico do cérebro de abelhas operárias *knockdown* para *mnb*.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 VISÃO GERAL E LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Foram utilizadas abelhas africanizadas provenientes do Apiário do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade da Universidade Federal de Alfenas, localizado no “Sítio das Rosas”, Alfenas, MG (Figura 3). Os experimentos foram realizados no Lab. de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas e no Centro de Biologia Experimental (CEBIOEX) da UNIFAL-MG.

Figura 3 – Obtenção de quadro do Apiário Experimental

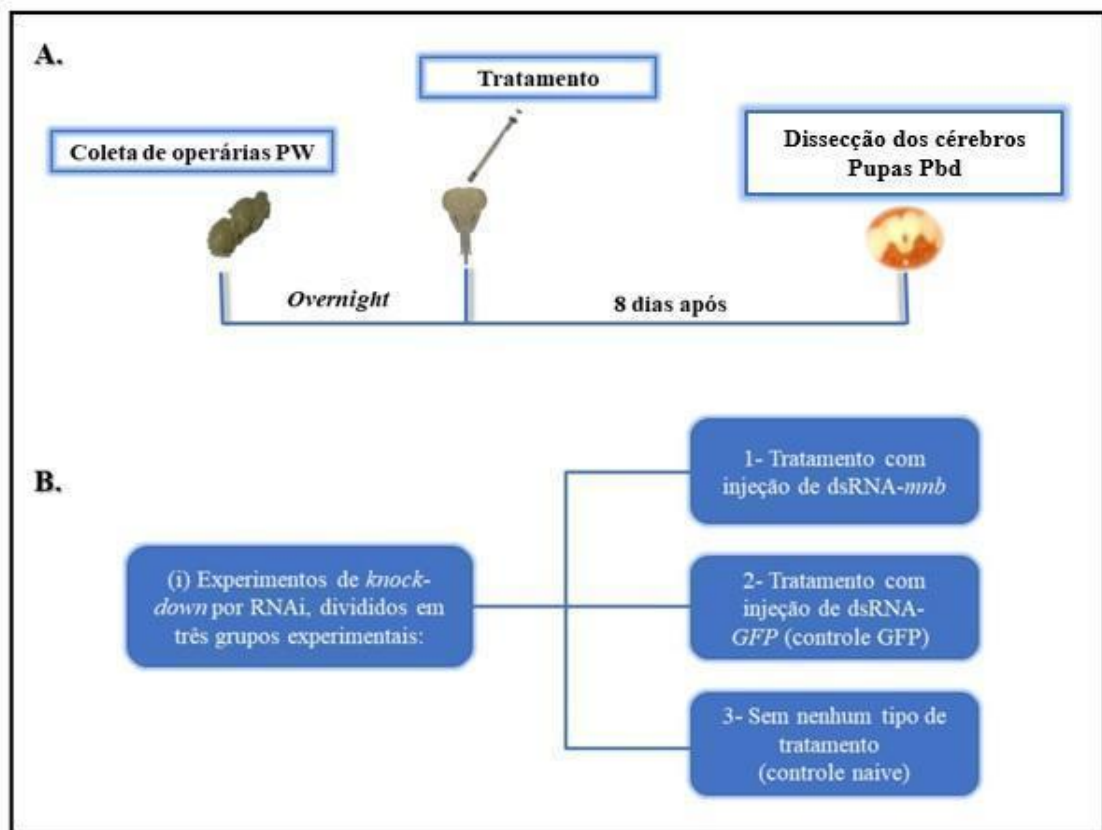


Fonte: Marcio Filho (2022).

O Projeto foi desenvolvido mediante a concretização de uma série de experimentos sequenciais de RNAi (*knockdown*, KD), como apresentado a seguir:

Experimento I – Avaliação fenotípica de pupas-faratas KD para *mnb* – obtenção de amostras 8 dias após a injeção (Figura 4): este primeiro experimento foi realizado injetando dsRNA na fase de pupa Pw (primeira fase pupal) e as análises fenotípicas foram realizadas na última fase do desenvolvimento pupal (Pbd) (para informações sobre o *timing* de desenvolvimento pupal, ver Tabela 1 e Figura 8).

Figura 4 – Resumo do desenho experimental utilizado para o Experimento I

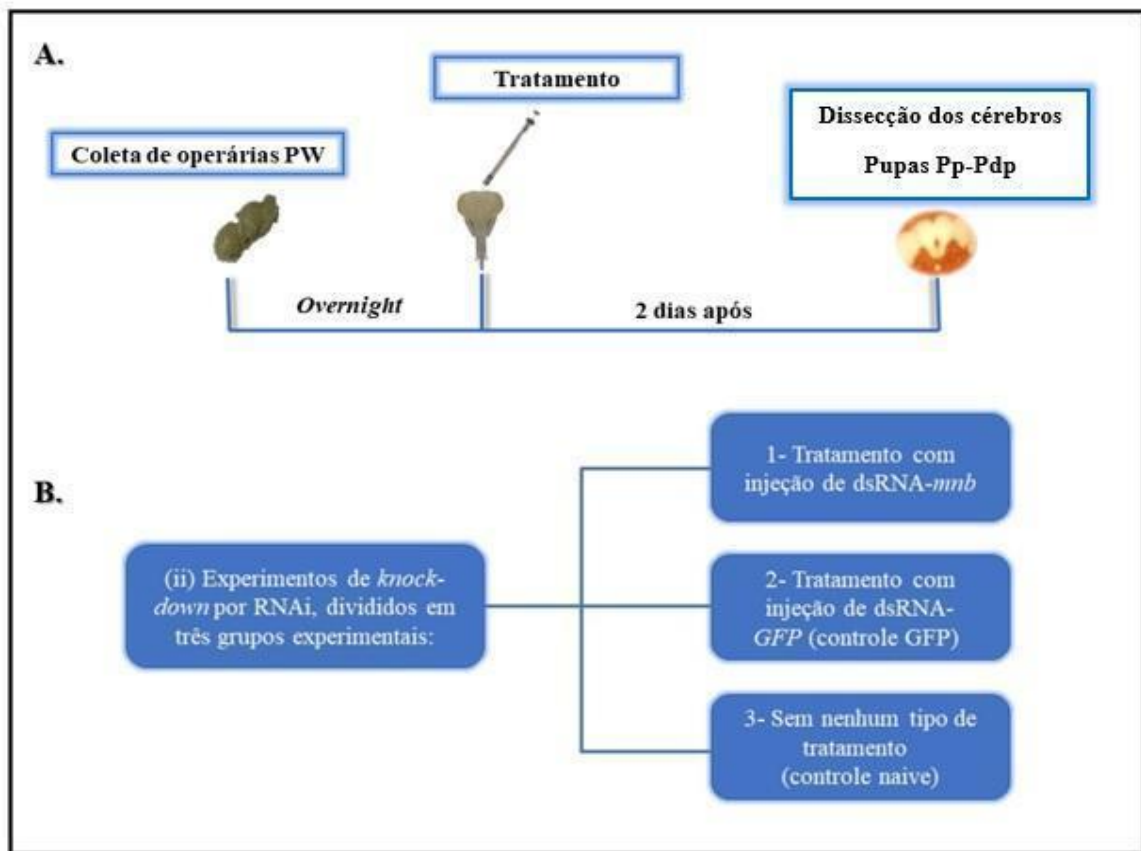


Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A) Visão geral do experimento, inicialmente foi feita a coleta das pupas Pw que seriam utilizadas, deixando-as *overnight* em estufa para garantir que estejam todas saudáveis para receber os tratamentos. No dia seguinte, as pupas saudáveis foram injetadas (exceto o controle naive) e devolvidas à estufa. Por fim, no oitavo dia após o tratamento, as pupas já em estágio Pbd foram dissecadas. B) Divisão dos grupos experimentais presentes neste experimento, consistindo em um grupo tratado com injeções de dsMNB, injeções de dsGFP e sem injeções.

Experimento II – Avaliação fenotípica de pupas-faratas KD para *mnb* – obtenção de amostras 2 dias após a injeção (Figura 5): este experimento foi realizado injetando dsRNA na fase de pupa Pw (primeira fase pupal) e as análises fenotípicas foram realizadas nas fases iniciais do desenvolvimento pupal (Pp-Pdp).

Figura 5 – Resumo do desenho experimental utilizado para o Experimento II

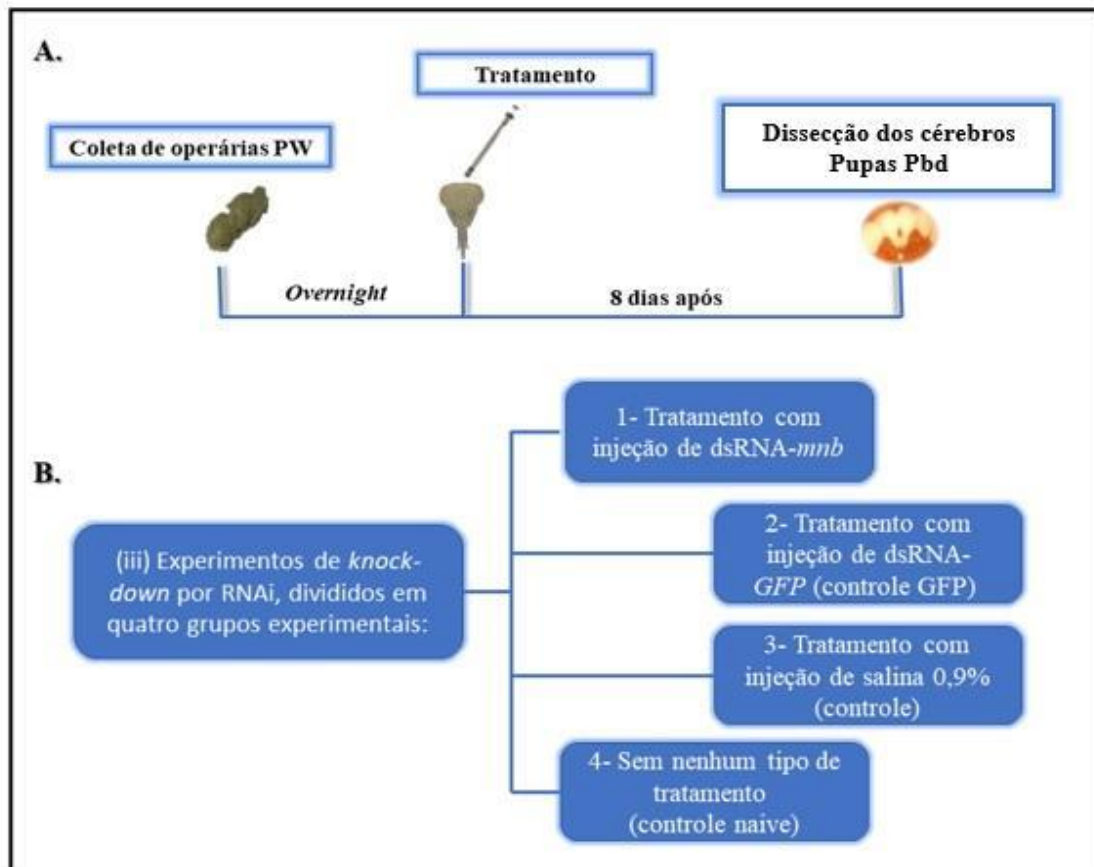


Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A) Visão geral do experimento, inicialmente foi feita a coleta das pupas Pw que seriam utilizadas, deixando-as overnight em estufa para garantir que estejam todas saudáveis para receber os tratamentos, no dia seguinte as pupas saudáveis foram injetadas (exceto o controle *naive*) e devolvidas à estufa, por fim, diferente do que havia sido feito no primeiro experimento, as pupas (Pp-Pdp) foram dissecadas no segundo dia após receberem o tratamento. B) Divisão dos grupos experimentais presentes neste experimento, consistindo em um grupo tratado com injeções de dsMNB, injeções de dsGFP e sem injeções.

Experimento III – Avaliação fenotípica de pupas-faratas KD para *mnb* – obtenção de amostras 8 dias após a injeção (Figura 6): este experimento foi realizado injetando dsRNA na fase de pupa Pw (primeira fase pupal) e as análises fenotípicas foram realizadas na fase final do desenvolvimento pupal (Pbd). Após a realização dos experimentos I e II, decidimos incluir mais um grupo controle, formado por pupas que receberam injeções de solução salina (NaCl 0,9%). Este grupo nos permitiu analisar se as injeções causavam algum dano tecidual ou ferimento nos indivíduos.

Figura 6 – Resumo do desenho experimental utilizado para o Experimento III



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A) Visão geral do experimento, inicialmente foi feita a coleta das pupas Pw que seriam utilizadas, deixando-as overnight em estufa para garantir que estejam todas saudáveis para receber os tratamentos, no dia seguinte as pupas saudáveis foram injetadas (exceto o controle naïve) e devolvidas à estufa, por fim, assim como no experimento II, as pupas (Pbd) foram dissecadas no oitavo dia após receberem o tratamento. B) Divisão dos grupos experimentais presentes neste experimento, consistindo em um grupo tratado com injeções de dsMNB, injeções de dsGFP, injeções de Salina 0,9% e sem injeções, diferindo dos demais experimentos.

## 3.2 PROTOCOLO PARA *KNOCK-DOWN* DE *MINIBRAIN* POR RNAi

### 3.2.1. Obtenção de pupas

Para a obtenção de pupas da fase desejada para injeção do dsRNA (Pw), foram retirados das colônias quadros contendo, no interior de seus alvéolos, pupas em fases iniciais do desenvolvimento (Figura 7). O quadro era colocado em estufa (Incubadora Bod refrigerada - modelo Luca-161/01) com temperatura de 36° C e umidade de 80%, a fim de mantê-lo em condições ideais até todas as pupas serem coletadas.

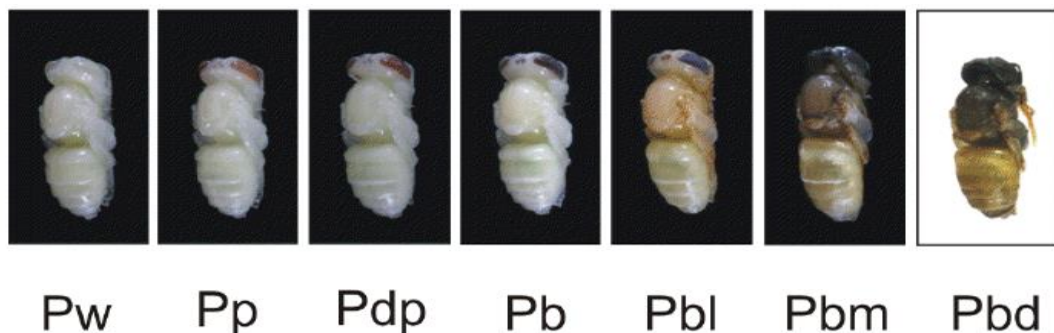
Figura 7 – Suporte em madeira no qual era encaixado o quadro retirado da colmeia para observação em laboratório. Permite que os usuários desoperculem os alvéolos e retirem as abelhas nas fases de desenvolvimento desejado



Fonte: Raissa Bayker (2022).

Para cada experimento (Figuras 4-6), coletamos, com auxílio de pinça entomológica, 150 pupas na fase Pw (Figura 8 e Tabela 1). As pupas de cada grupo foram alocadas em placas de Petri com papel filtro e deixamos *overnight* em estufa (Incubadora Shaker - Ethiktechnology) a 34°C de temperatura e 80% de umidade. Para alcançar a umidade desejada, as placas foram colocadas em um pote plástico (22,5 x 21,5 x 9,5 cm) com um recipiente com água.

Figura 8 – Características fenotípicas externas de pupas de operárias *Apis mellifera* ao longo de seu desenvolvimento



Fonte: Modificado de Micas (2012).

Tabela 1 – Características utilizadas para classificar o desenvolvimento pós-larval de operárias e rainhas de *Apis mellifera* africanizadas

Fase	Caracterização
Pw	Pupa de olho Branco ( <i>White</i> )
Pp	Adulto-farato de olho rosa ( <i>Pink</i> )
Pdp	Adulto-farato de olho rosa-escuro
Pb	Adulto-farato de olho marrom ( <i>brown</i> )
Pbl	Adulto-farato de olho marrom, com pigmentação torácica leve
Pbm	Adulto-farato de olho marrom, com pigmentação torácica intermediária
Pbd	Adulto-farato de olho marrom, com pigmentação torácica forte
NE	Adulto recém-emergido

Fonte: Modificado de Michelette; Soares (1993).

### 3.2.2 Obtenção de dsRNAs e injeção em pupas

A estratégia geral para a síntese e injeção de dsRNA nas abelhas seguiu o protocolo descrito por Amdam *et al.* (2003) e Barchuk *et al.* (2008). Para a síntese de dsRNAs, primeiro amplificamos fragmentos clonados do cDNA de *mnb* e de *gfp*, que serviram como moldes para a síntese posterior dos respectivos dsRNAs. A amplificação de fragmentos de *mnb* e *gfp* para a produção das moléculas de RNA de dupla fita foi feita utilizando a proporção de: 360 µL de Platinum, 12 µL de primer R, 12 µL de primer F e 20 µL de cDNA. Os primers de *mnb* e *gfp* (Tabela 2) haviam sido produzidos com adição de cauda T7, de acordo com as necessidades do nosso laboratório. Os produtos de amplificação de *mnb* (543 pb; ver Anexo I) e GFP (500 pb) foram identificados em gel de agarose e purificados usando colunas QIAquick™ (QIAGEN). As reações de transcrição foram realizadas *in vitro* usando o RiboMax™ Sistema T7 (Promega), e o dsRNA obtido foi isolado usando reagente TRIzol® Reagent (Ambion; ref 15596078; lot 390204) e diluído em água estéril. Para garantir a viscosidade adequada para a microinjeção, a concentração da solução de trabalho de dsRNA foi de 5 µg/µL. A qualidade do RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose.

Para realizar a etapa de injeções dos experimentos, as pupas coletadas e mantidas em estufa *overnight* foram separadas ao acaso em 3 grupos de 50 indivíduos cada um

(Experimentos I e II): (i) controle naive (s/injeções), (ii) controle GFP (receberam injeções de dsRNA de GFP), e (iii) MNB (receberam injeções de dsRNA para *mnb*). Para o Experimento III, foram realizados os mesmos procedimentos, sendo acrescentado um grupo controle com injeções de solução NaCl 0,9%. Escolhemos o uso do método de injeções, pois a injeção é necessária para estudos do cérebro, porque a bainha neural impede a entrada de moléculas de si- e ds-RNA (Xiaojiao Guoa, 2018).

As pupas foram injetadas com 2  $\mu$ L de solução de dupla fita para ambos dsMNB e dsGFP (5  $\mu$ g de dsRNA) no cérebro (na região entre os ocelos; Figura 9) na fase Pp (dia seguinte à obtenção da colônia) usando uma microseringa do tipo Hamilton (NanoFil; 0,01 mL; agulha NF35BV-2). A quantidade de dsRNA injetada foi baseada em trabalhos prévios (Barchuk *et al.*, 2008; Galetto *et al.*, 2021; Prentice *et al.*, 2016). As pupas controle receberam 2  $\mu$ L de solução de NaCl 0.9%. Os indivíduos dos grupos que receberam injeções foram devolvidos à estufa, bem como o grupo naive.

Figura 9 – Ilustração da aplicação das injeções da solução de dsRNA na região entre ocelos de operárias *Apis mellifera* em desenvolvimento, destacada na figura



Fonte: Elaboração própria.

### 3.2.3 Dissecção de cérebros

As dissecções dos cérebros foram feitas no segundo ou no oitavo dia após as pupas receberem o tratamento, contabilizando 15 cérebros de cada grupo, sendo 5 tubos com 3 cérebros por grupo. A coleta de material no segundo dia após as injeções teve como objetivo

determinar em qual dia após receber o tratamento ocorre a queda do *mnb*.

Para proceder às análises dos níveis de transcrição e morfométricas, os cérebros foram obtidos por meio de dissecação em solução salina estéril (NaCl 0,9%), em temperatura ambiente. Com auxílio de alfinetes, as abelhas foram fixadas em uma placa de Petri contendo parafina sólida, a qual foi posicionada em lupa Carl Zeiss - Stemi 305. Utilizando pinças cirúrgicas de ponta afiada, a cutícula da região cefálica foi retirada e o cérebro localizado. Para as análises moleculares, os cérebros foram transferidos cuidadosamente com o auxílio de uma pinça para microtubos de 2 mL contendo 100 µL de reagente TRIzol® Reagent (Ambion; ref 15596078; lot 390204), totalizando 15 cérebros por tratamento, os quais foram divididos em 5 tubos com 3 cérebros. Os tubos contendo as amostras foram armazenados em freezer a uma temperatura de -80°C até o momento da extração do RNA. Para as análises morfológicas, os cérebros foram transferidos cuidadosamente com o auxílio de uma pinça para microtubos de 2 mL contendo uma solução de fixador de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Foram dissecados 5 cérebros por grupo experimental, totalizando 15 cérebros.

### **3.2.4 Extração de RNA total**

Para proceder à extração de RNA das amostras de cérebros foi utilizado o protocolo de extração do reagente TRIzol® Reagent (Ambion; ref 15596078; lot 390204), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, as amostras (cada microtubo com 3 cérebros) foram maceradas em TRIzol® até a formação de uma solução homogênea e deixadas em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 100 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e deixados em repouso novamente a temperatura ambiente por 2-3 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos sob rotação de 12000 xg a 4°C. Decorrido o tempo de centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos onde foram adicionados 250 µL de álcool isopropílico, o conteúdo foi homogeneizado por inversão e armazenado a -20°C (overnight). No dia seguinte as amostras foram centrifugadas por 1 hora (12000 xg a 4°C). Após a centrifugação foi possível observar a precipitação do RNA no fundo dos tubos. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de RNA foram lavados duas vezes com 1 mL de etanol 75%. A lavagem foi feita por meio de inversão manual seguida de centrifugação por 5 minutos (7500 xg a 4°C). Após as lavagens e o descarte dos sobrenadantes o RNA foi colocado em termobloco a 55°C por 10 minutos e ressuspenso com 20 µL de água DEPC.

Para verificar a concentração e a pureza do RNA extraído as amostras foram submetidas a espectrofotometria em Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) em comprimento de onda igual a 260 e 280 nanômetros. Para a determinação da pureza das amostras, foi calculada a razão entre as leituras de 260 e 280 nanômetros, que deve estar entre 1,9 e 2,0, tendo em vista que os ácidos nucleicos absorvem mais luz no comprimento de onda 260 nm e proteínas 280 nm. Valores abaixo de 1,7 indicam contaminação com proteínas, fenóis ou surfactantes (Teare *et al.*, 1997). Uma unidade de absorbância foi considerada como correspondente a 40 µg/mL de RNA (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989).

### 3.2.5 Análise por RT-qPCR em tempo real

De cada uma das amostras de RNA extraídas dos cérebros de pupas foi usado 1 µg como molde para a síntese de cDNA por meio de transcrição reversa usando SuperScript® II Reverse Transcriptase (Cat. No. 18064-022, Invitrogen) e Oligo dT<sub>12-18</sub> (Cat 18418-012 Invitrogen) como *primer*.

As análises dos níveis de transcrição gênica foram feitas por meio de qPCR em tempo real utilizando SYBR® Green no sistema 7500 Real time PCR (Applied Biosystems). As condições da reação foram: em cada tubo foram adicionados 7,4 µL de água Milli Q estéril, 10 µL de SYBR® Green Real Time PCR Master Mix, 0,8 µL de primer-F (10 µM), 0,8 µL de primer-R (10 µM) e 1 µL de cDNA (amostra). O termociclador foi programado para executar um ciclo de 2 minutos a 50°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 minutos a 95°C e 1 minuto a 58°C, seguido de um ciclo final de 15 segundos a 95°C. Os dados de Ct foram coletados e posteriormente analisados estatisticamente, tendo os genes Actina e RPL-32 como referência (Tabela 2).

Tabela 2 – Características dos primers usados nos ensaios de PCR

Gene	Sequência dos <i>Primers</i>		Tamanho do fragmento (pb)
	Forward	Reverse	
<i>rpl32</i>	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	TTGAGCACGTTCAACAATGG	156
<i>mnb</i>	AAGGGAAATGAGAACGGGAAA	CAAAACGATGAAATGCAAAGCA	70
<i>mnb</i> *	GCGATCTATTTAGTGGGGCCAACG	GCGATCCATAGGCTGATAGCCAC C	543
<i>gfp</i> *	GCGAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGA	GCGAGGTAAAAGGACAGGGCCA TC	500

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Temperatura de amplificação = 60°C. \*Usado no protocolo de produção de dsRNA e inclui a seguinte sequência adicional (sítio de reconhecimento para a RNA polimerase T7): TAATACGACTCACTATAGG.

As análises moleculares contaram com a fundamental colaboração da Dra. Juliana R. Martins, Técnica do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da UNIFAL-MG.

### 3.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

#### 3.3.1 Preparação Histológica

A preparação histológica do material é uma etapa fundamental para posterior análise da morfologia. Depois de dissecados, os cérebros foram mantidos no fixador Karnovsky (Karnovsky, 1965) por, no mínimo, 24 horas em tubo Eppendorf de 2 mL (de fundo arredondado). Esta etapa consiste na utilização de substâncias que interrompam o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, mantendo, assim, a arquitetura normal do tecido. Além disso, os fixadores também fornecem

maior resistência ao tecido para suportar as demais etapas. A solução de Karnovsky foi preparada para um volume final de 100 mL, sendo assim, foram utilizados 50 mL de paraformaldeído a 8%, 10 mL de glutaraldeído 25% e 40 mL de tampão fosfato 0,2M, pH 7,3.

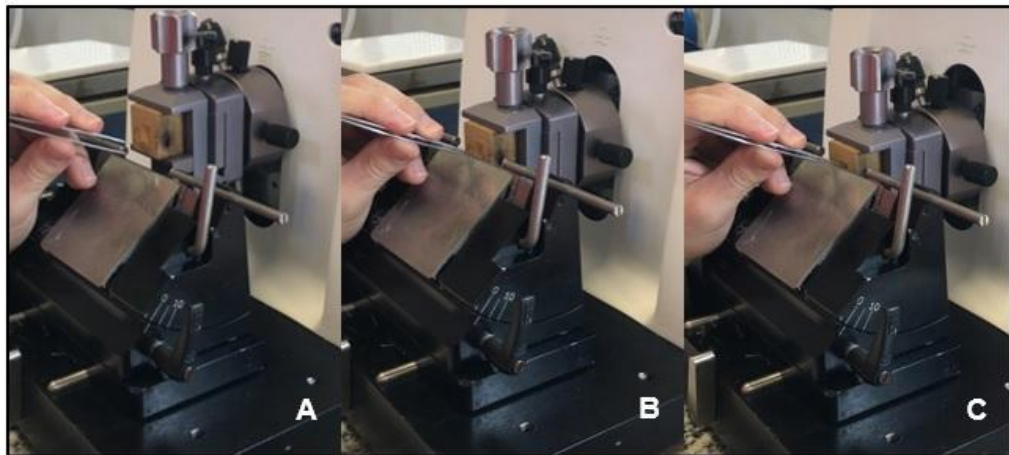
Após a fixação do material, foi realizada a desidratação das amostras: os cérebros passaram por uma bateria de álcool das seguintes concentrações: 70%, 80%, 90% e 95%, sendo que cada troca de álcool foi feita de 15 em 15 minutos, duas vezes a cada gradação, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Depois de desidratados, os cérebros foram colocados em solução de pré infiltração contendo resina + álcool 95% e deixados imersos *overnight* em geladeira. Posteriormente, foram colocados em resina de infiltração e armazenados novamente na geladeira por 2 ou 3 dias, até a etapa de inclusão.

Para a inclusão, os cérebros foram transferidos para histomoldes com uma solução de resina de inclusão + endurecedor. Em seguida, os histomoldes foram armazenados na estufa de resina por 24 h a uma temperatura de 40°C para uma polimerização mais efetiva do material, e no dia seguinte as resinas (com os cérebros) foram retiradas da forma e coladas em bloquinhos de madeira com cola do tipo *superbonder*.

### **3.3.2 Preparação do Material para Microscopia de Luz**

As amostras (cérebros das abelhas) foram fixadas em Karnovsky por, pelo menos, 24h, desidratadas em etanol e incluídas em historesina (Leica). Cada amostra foi seccionada totalmente no sentido longitudinal, através de cortes histológicos seriados com 3 µm de espessura. Os cortes histológicos, obtidos em micrótomo equipado com navalhas de vidro, foram corados com Hematoxilina-Eosina para as análises citoquímicas e documentados através de um sistema de captura digital acoplado a um microscópio (Bioptika B20T), utilizando o software Amscope MU1000.

Figura 10 – Amostra sendo seccionada através de corte histológico seriado



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A) Bloco de resina posicionado em micrótomo preparado para ser seccionado totalmente em sentido longitudinal através de cortes histológicos seriados; B) Início do corte histológico seccionado em sentido longitudinal; C) Fim do corte histológico seccionado em sentido longitudinal.

### 3.3.3 Morfometria

Para o cálculo dos volumes totais das diferentes regiões cerebrais (Fig. 1), as áreas de todos os cortes histológicos seriados do grupo controle (n=5) e do grupo tratado (n=5) foram calculadas em  $\mu\text{m}^2$ , utilizando o software Amscope MU1000. Posteriormente, a soma das áreas de cada porção foi multiplicada por 3  $\mu\text{m}$  (espessura do corte histológico), a fim de se obter o cálculo final do volume em  $\mu\text{m}^3$ . O valor final em unidades de  $\mu\text{m}^3$  foi então convertido para unidade de microlitro ( $\mu\text{L}$ ). Esses dados apresentados na forma de “média” + “desvio padrão” foram submetidos ao teste de Tukey (Statistica® 7.0), após análise de variância (one way ANOVA).

## 4 RESULTADOS

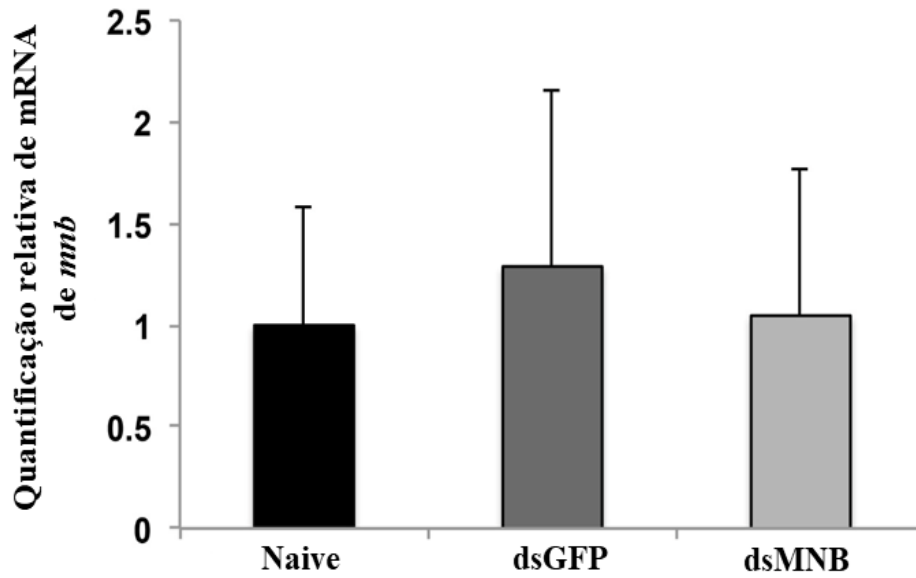
### 4.1 EXPERIMENTO #1

No marco do experimento #1 de nosso trabalho, tivemos uma primeira aproximação ao método experimental estabelecido para avaliar parâmetros moleculares indicadores de *knock-down* de *mnb* em operárias. Determinamos através de qPCR os níveis relativos de mRNA de *mnb* e também avaliamos o fenótipo morfológico dessas abelhas.

As análises moleculares com cérebros coletados no oitavo dia após receberem os tratamentos não mostraram diferença estatística entre os níveis de transcritos de *mnb* das abelhas dos diferentes grupos experimentais (*gfp*, *mnb* e controle naíve) (Gráfico 1). Entretanto, demos seguimento ao plano inicial e ao realizar as análises histológicas percebemos grande mudança na estrutura cerebral das pupas (Figura 9).

Os cérebros que haviam recebido injeções de *dsMNB* eram menores que os cérebros das pupas controles (tinham suas estruturas menos desenvolvidas), sugerindo a ocorrência de *knock-down* (KD), mesmo com a detecção de níveis normais de transcrição de *mnb* na fase analisada. Hipotetizamos que houve KD nas abelhas injetadas, porém, o sistema de RNAi perdeu eficiência com o decorrer dos dias de desenvolvimento do adulto-farato. Para testar esta hipótese, planejamos e desenvolvemos um segundo experimento coletando os cérebros no segundo dia após receberem os tratamentos (Experimento II).

Gráfico 1 – Resultado da qPCR comparando a expressão de *minibrain* nos grupos que receberam injeções dsGFP, dsMNB e controle (s/injeção)

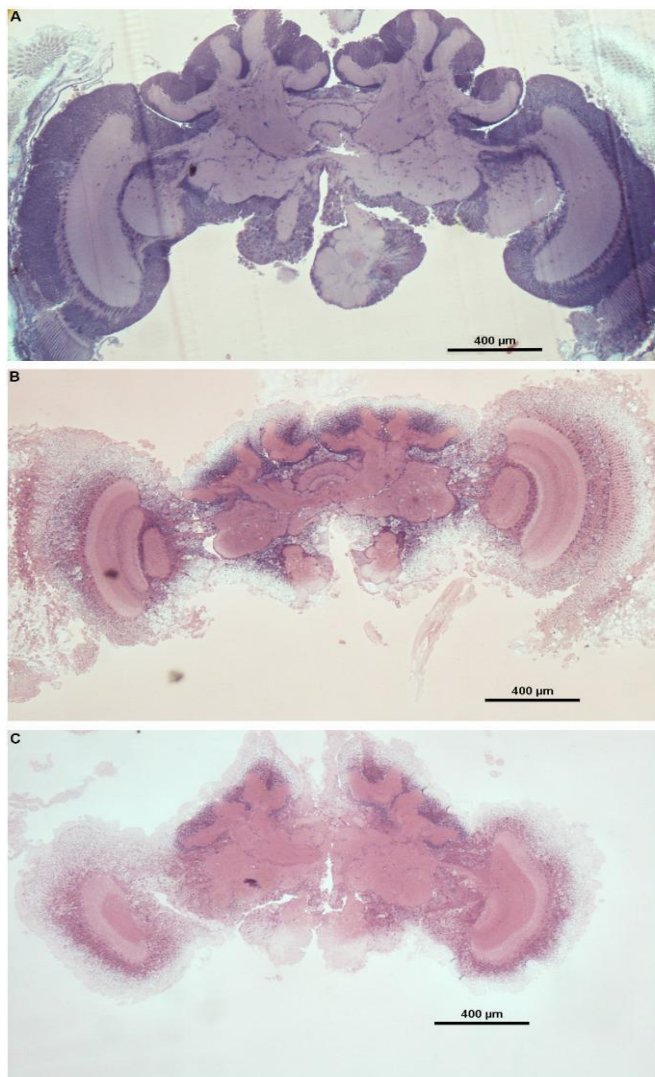


Fonte: Juliana R. Martins (2021).

Legenda: Médias e DP de níveis de transcritos de *mnb*. As médias de dsGFP e dsMNB não apresentam diferença estatística significativa, bem como quando comparadas ao controle naive.

Na figura 11, em (A) temos um cérebro do controle naive, o qual visivelmente não apresenta nenhuma alteração morfológica; em (B) temos um cérebro do grupo dsGFP, o qual se mostra menor quando comparado ao A; já em (C) temos um cérebro do grupo dsMNB, o qual se mostra menor que os apresentados em A e B, sugerindo uma alteração morfológica causada pelo KD.

Figura 11 – Imagens representativas de cérebros de pupas operárias que receberam injeções de dsGFP, dsMNB e controle (s/injeção)

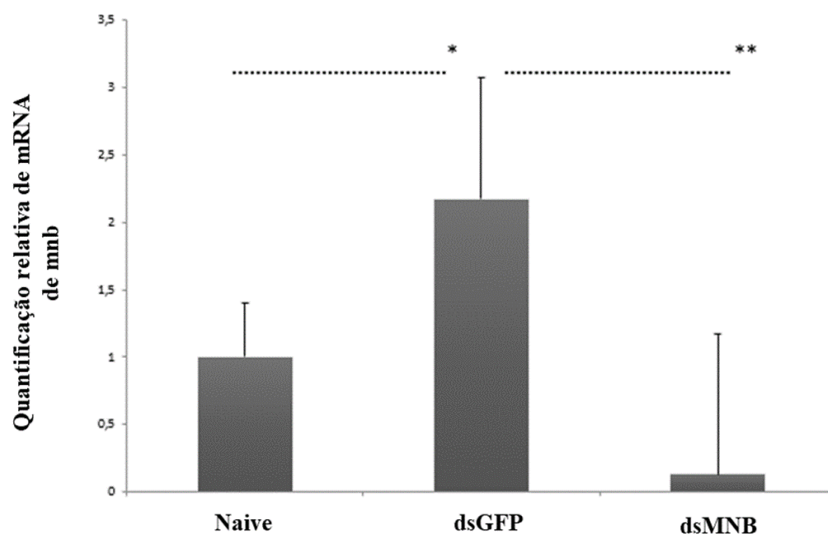


Fonte: Juliana R. Martins (2021).

## 4.2 EXPERIMENTO #2

Com o intuito de analisar o comportamento do gene *mnb* e o *timing* do seu *knock-down* durante o desenvolvimento de operárias adultas de *A. mellifera* desenvolvemos nosso Experimento #2. Nele, os cérebros foram coletados no segundo dia após receberem o tratamento. Os resultados desta vez foram bem diferentes quando comparados ao primeiro. Observamos uma diferença entre a quantidade de transcritos de *mnb* entre o grupo tratado (dsMnb) e o controle (dsGFP) (ANOVA One-way  $p < 0,02$ ; gráfico 2). Este resultado indica claramente a ocorrência do *knock-down* de *mnb* nas pupas tratadas com dsRNA para o gene em estudo.

Gráfico 2 – Resultado da qPCR comparando expressão de *minibrain* nos grupos que receberam injeções dsGFP, dsMNB e controle (s/injeção)



Fonte: Elaboração própria.

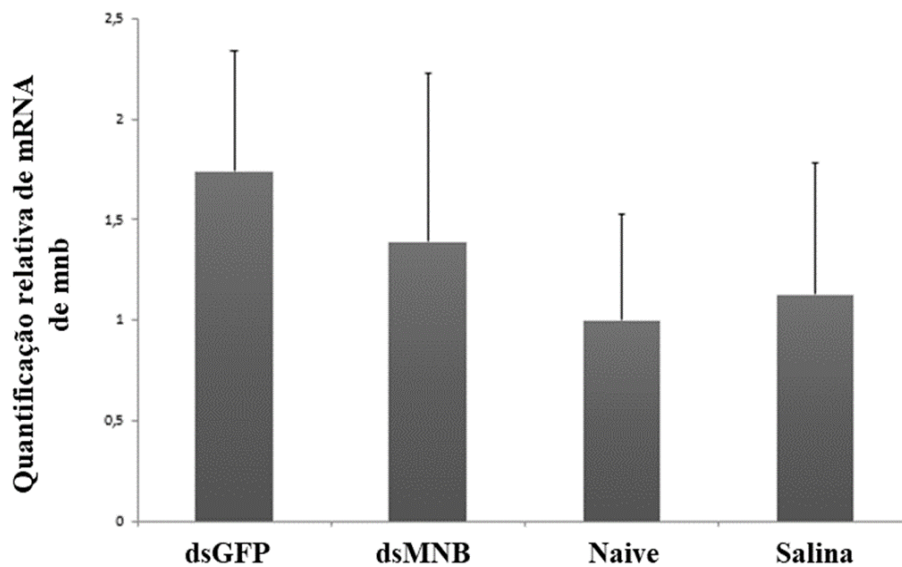
Legenda: Média e DP de transcritos de *mnb*. A última média indica as pupas que receberam dsMNB, mostrando níveis menores de transcritos quando comparada com as demais colunas (dsGFP e naive). Test ANOVA One-way (\*  $p < 0,02$  | \*\*  $p < 0,01$ ).

## 4.3 EXPERIMENTO #3

Nosso Experimento #3 foi desenvolvido com a inclusão de um terceiro grupo controle, constituído por pupas que receberam injeção de NaCl 0,9%. Isto foi feito com o intuito de confirmar a efetividade de nossos controles e observar se as injeções afetam negativamente nossas pupas.

Para as análises de qPCR, neste caso, coletamos os cérebros no oitavo dia após as pupas receberem os tratamentos, para que pudéssemos ver se o *knockdown* se estenderia por um período de tempo ou o gene se recuperaria. O gráfico 3 nos mostra o resultado das análises, semelhantes aos do Experimento #1.

Gráfico 3 – Resultado da qPCR comparando expressão de *minibrain* nos grupos que receberam injeção de dsGFP, dsMNB, controle salina 0,9% e controle naive (s/injeção)



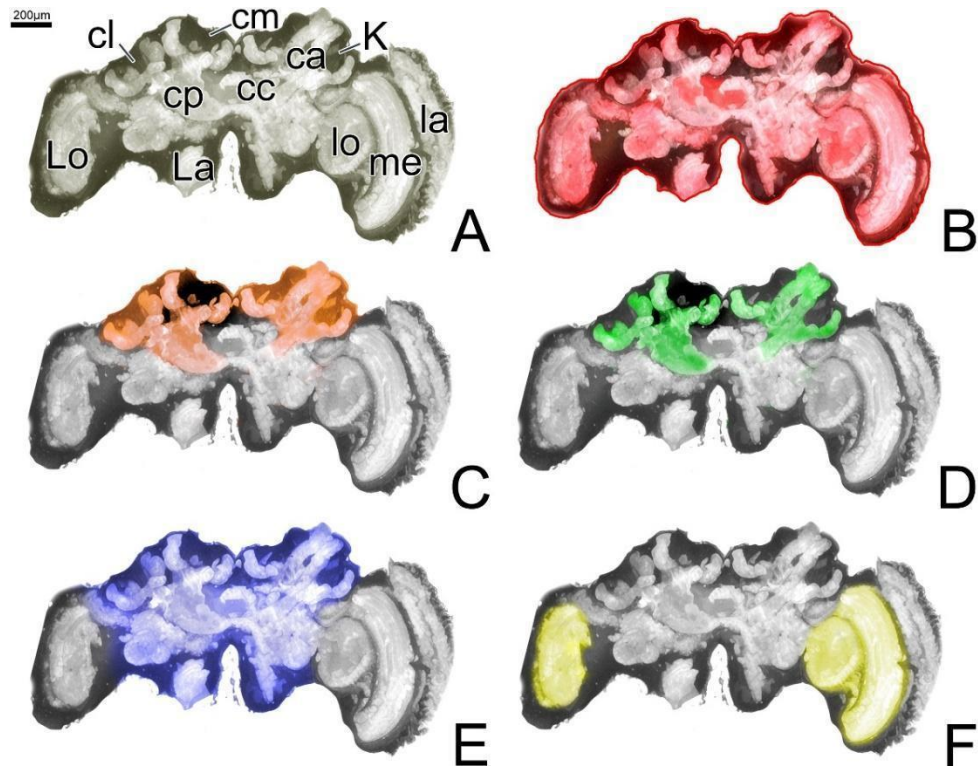
Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Média e DP de transcritos de *mnb*. A última média indica o controle com salina 0,9% que quando comparado aos demais controles (dsGFP e naive) não apresentam diferença estatística.

#### 4.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS CÉREBROS DE ABELHAS *APIS MELLIFERA*

Com o objetivo de determinar se existe diferença no volume total dos cérebros de abelhas operárias *A. mellifera*, 5 cérebros de cada grupo experimental foram dissecados, incluídos em historesina e corados para análise microscópica (total de 10 cérebros). Inicialmente elaboramos imagens de todas as regiões nervosas, mapeando as porções cerebrais que seriam analisadas, para assim possibilitar calcularmos os volumes desejados (Figura 10).

Figura 11 – Esquema representativo das regiões cerebrais da abelha, salientando as utilizadas para a morfometria e cálculo do volume

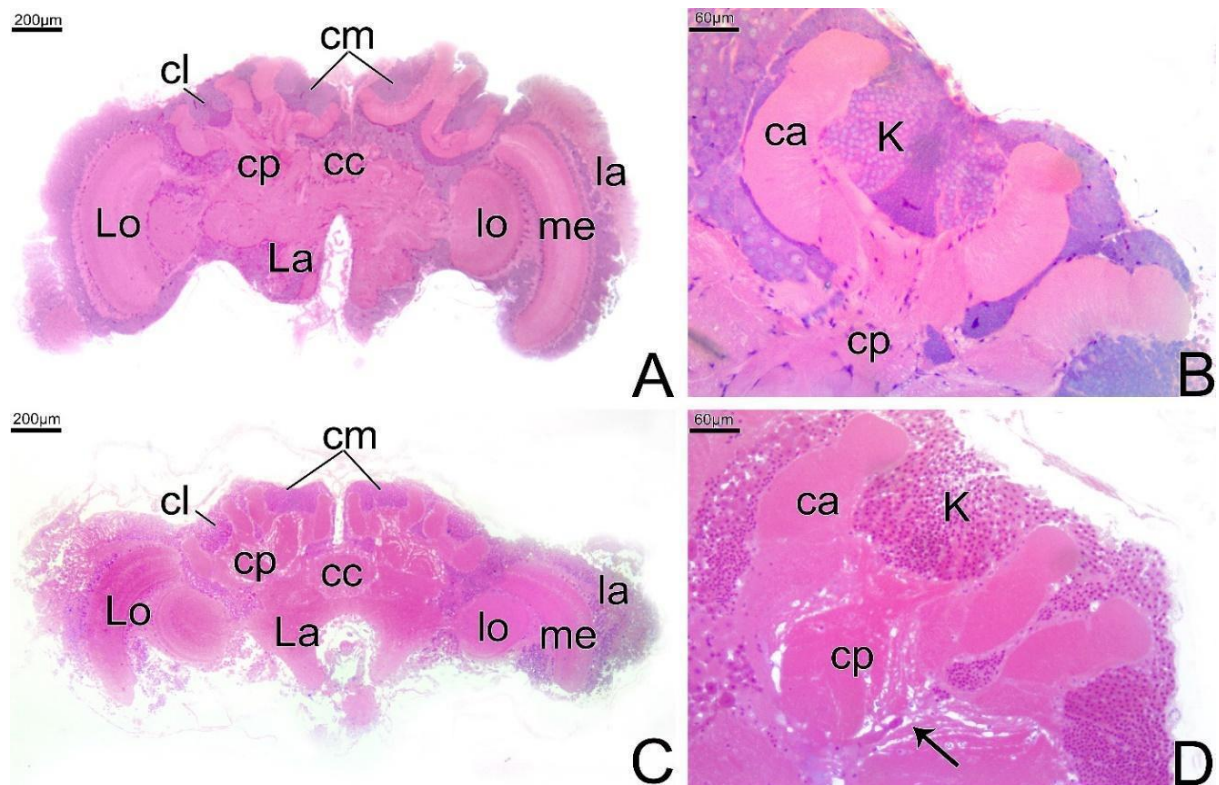


Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A) Visão panorâmica da estrutura nervosa total. B) Tecido nervoso total (em vermelho), constituído pelo cérebro e lobo óptico (exceto pela região medular). C) Corpo cogumelar (em laranja), formado pelo corpo pedunculado em associação às células Kenyon. D) Corpo pedunculado (em verde). E) Cérebro (em azul). **Abreviações:** cl: cálice lateral; cm: cálice medial; ca: cálice; cp: corpo pedunculado; cc: corpo central; Lo: lobo óptico; La: lobo antenal; lo: lóbulo; me: medula; la: lamela; K: células Kenyon.

Após a elaboração do esquema com as regiões cerebrais a serem medidas e analisadas, o próximo passo foi realizar uma comparação entre os cortes histológicos dos cérebros que receberam injeção de dsGFP e de dsMNB (Figura 11). Ao fazer tal comparação, foi possível perceber uma considerável diferença nos núcleos das células Kenyon presentes nos corpos cogumelares e nos corpos pedunculares, sendo que, nos cérebros do grupo dsGFP os núcleos das células Kenyon encontravam-se bastante descondensados e o corpo pedunculado estruturado. Já nos cérebros do grupo dsMNB, os núcleos das células Kenyon encontravam-se bastante condensados e o corpo pedunculado fenestrado.

Figura 12 – Corte histológico longitudinal do cérebro de abelha

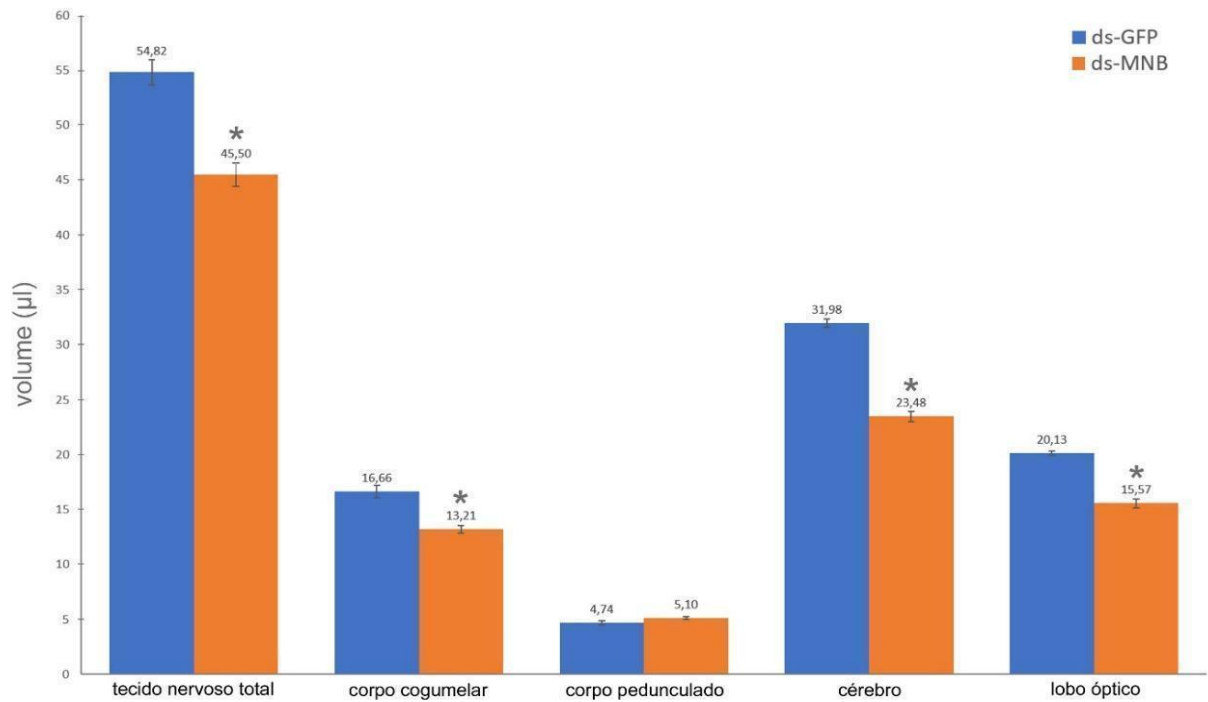


Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A) Cérebro do grupo controle (ds-GFP). B) Detalhe de A, mostrando região do corpo cogumelar. Notar os núcleos das células Kenyon bastante descondensados e corpo pedunculado estruturado. C) Cérebro do grupo tratado (ds-MNB). D) Notar os núcleos das células Kenyon bastante condensados e corpo pedunculado fenestrado. **Abreviações:** cl: cálice lateral; cm: cálice medial; ca: cálice; cp: corpo pedunculado; cc: corpo central; Lo: lobo óptico; La: lobo antenal; lo: lóbulo; me: medula; la: lamela; Kc: células Kenyon; seta: fenestras. **Coloração:** Hematoxilina-Eosina.

Em seguida, foram feitas as medidas das regiões cerebrais analisadas e seus volumes foram calculados. Os resultados mostraram que os volumes do tecido nervoso total, do corpo cogumelar, do cérebro e do lobo óptico das pupas de ambos os grupos experimentais (dsGFP e dsMNB) são diferentes (Gráfico 4). De maneira que, no grupo dsMNB a média dos volumes dos corpos cogumelares foi de 13,21 uL, dos cérebros 23,48 uL, dos lobos ópticos 15,57 uL e do tecido nervoso total 45,50 uL, enquanto no grupo dsGFP as médias dos volumes calculados se apresentaram superiores quando comparamos, sendo corpos cogumelares 16,66 uL, cérebros 31,98 uL, lobos ópticos 20,13 uL e o tecido nervoso total 54,82 uL. Estes resultados revelam que os indivíduos que receberam o dsMNB tiveram seu volume cerebral diminuído em relação aos do grupo controle, exceto o corpo pedunculado que não apresentou diferença significativa.

Gráfico 4 – Representação gráfica da média e do desvio padrão dos volumes das diferentes regiões cerebrais em indivíduos do grupo controle (n=5) e do grupo tratado (n=5) em microlitros ( $\mu\text{l}$ )



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: \*Diferença significativa do grupo tratado em relação ao grupo controle. Teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DE PUPAS *knockdown* PARA *mnb* E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOLECULARES

Nossos resultados mostram que 10 µg de dsRNA aplicado na região cefálica de pupas Pp levam à diminuição nos níveis de transcritos de *mnb* logo após 24h e que os níveis de transcritos se recuperam durante o desenvolvimento pupal. Os resultados das análises morfológicas sugerem, por outro lado, que mesmo o *knockdown* transitório conduz a um menor desenvolvimento do cérebro das pupas tratadas, salientando o papel de *mnb* no processo.

Ao contrastar os resultados derivados das análises moleculares, uma conduzida com amostras coletadas no segundo dia após as injeções e outra com amostras obtidas no oitavo dia após as injeções, torna-se aparente que o gene experimentou um processo de silenciamento que, ao longo do desenvolvimento, posteriormente se recuperou. Este fenômeno é notável dado que o referido gene manifesta sua expressão ao longo de todo o período pupal da abelha (Paula Jr *et al.*, 2021).

A extensão do *knockdown* gênico e o impacto desse *knockdown* podem variar entre organismos distintos, em diferentes tecidos e em relação a diferentes genes-alvo (Mittal, 2004). Essa variação está condicionada à construção específica do siRNA, ao método de entrega empregado e à dose das moléculas de RNAi (Mittal, 2004). Pesquisas também indicam que uma considerável diversidade nos efeitos de *knockdown* tanto por dsRNA (Loy *et al.*, 2012; Pridgeon *et al.*, 2008) quanto por siRNA (Krautz-Peterson *et al.*, 2007) pode surgir em decorrência do direcionamento do *knockdown* a diferentes regiões do gene. Em nossos ensaios, o fragmento utilizado para injeção incluía boa parte da região codificadora central do mRNA de *mnb*, gene para o qual não foram reportadas variantes transcricionais em *A. mellifera*.

Ao direcionar este gene por meio de injeções com dupla fita e obter o efeito *knockdown*, constatamos, por meio de análises histológicas, que os cérebros apresentaram um desenvolvimento reduzido. Isso indica que, em um estágio específico do desenvolvimento pupal, a ausência da expressão do gene resultou em impactos adversos no desenvolvimento cerebral. Esses resultados confirmam o papel crucial do gene *mnb* no processo de desenvolvimento do cérebro de operárias de *A. mellifera*. Esses resultados nos mostram que mesmo o gene se expressando desde o começo do desenvolvimento pupal e recuperando sua transcrição ao longo dos dias, esse *knockdown* que ocorreu no segundo dia após a injeção de

dupla fita é o suficiente para determinar as diferenças morfológicas observadas no primeiro experimento.

A escolha do método de injeção na região cefálica, em detrimento do método oral de tratamento com dupla fita ou injeções na hemolinfa, visa alcançar o local específico que desejamos analisar, garantindo maior efetividade no processo. No entanto, como contraponto, surge a discussão sobre a probabilidade de danos teciduais no sítio da injeção, conforme abordado por Aronstein *et al.* (2006). Em nossos ensaios, porém, não registramos alterações fenotípicas compatíveis com danos teciduais ao animal. Essa constatação baseia-se na utilização de diferentes grupos de controle para avaliar especificamente esse aspecto, e em ambos os grupos de controle não houve discrepância significativa no número de óbitos das pupas. Isso sugere que o estresse gerado pela injeção não é prejudicial nem fatal para as pupas. Dessa forma, foi possível validar a eficácia do método, afastando assim quaisquer considerações relacionadas a possíveis danos teciduais.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO MORFOLÓGICO DE ABELHAS OPERÁRIAS *knockdown* PARA *mnb*

Após todo o processo de obtenção de pupas *knockdown* para *mnb* e análise molecular para comprovar esse processo, partimos então para as análises morfológicas a fim de comprovar a ideia inicial do trabalho e compreender de que maneira esse gene age no desenvolvimento e diferenciação cerebral de abelhas operárias.

O cérebro de *A. mellifera* e de outros insetos pode ser dividido em duas regiões distintas: uma supraesofágica, que abriga o protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro, e uma porção subesofágica (Howse, 1975). No protocérebro, encontram-se os lóbulos ópticos, o complexo central e um par de corpos cogumelares. O deutocérebro é responsável pelos lóbulos dorsais e antenais, enquanto o tritocérebro é composto por dois lóbulos laterais (Azevedo & Nocelli, R., 2023).

Os corpos cogumelares, estruturas emparelhadas situadas simetricamente em ambos os lados do protocérebro, consistem em aproximadamente 170.000 células Kenyon. Essas células desempenham o papel de neurônios intrínsecos nessa configuração cerebral (Kenyon, 1896).

A formação de células de Kenyon nos corpos pedunculados das operárias de *A. mellifera* tem início no primeiro estágio larval e interrompe-se de forma abrupta na metade do período pupal, especificamente no período P4, de acordo com Ganeshina *et al.* (2000). Este estágio,

conforme descrito por esses autores, é marcado por pupas com olhos de tonalidade marrom escuro e corpo de coloração branca (Pb).

Os hormônios ecdisteroides desempenham um papel crucial no controle da atividade mitótica das células de Kenyon durante a neurogênese nos estágios iniciais do desenvolvimento das abelhas, especialmente durante os estágios pupais, nos quais a neurogênese é proeminente. Cada corpo pedunculado possui seu próprio centro de proliferação, conforme descrito por Panov (1957), Malun (1998), e Farris *et al.* (1999). A neurogênese das células de Kenyon em *A. mellifera* tem início no primeiro estágio larval, conforme evidenciado por Panov (1957) e Malun (1998), persistindo até o estágio pupal 4, quando cessa abruptamente em um único estágio, conforme indicado por Ganeshina *et al.* (2000).

Uma vez que não há proliferação de neuroblastos em adultos de *A. mellifera*, todas as células de Kenyon presentes no cérebro são geradas durante o período pós-embrionário. De acordo com Witthoft (1967), aproximadamente 340.000 células de Kenyon estão presentes nos corpos pedunculados dos adultos. A considerável quantidade de células justifica as extensas áreas de proliferação celular e o prolongado período durante o qual esse processo ocorre.

Os autores Ganeshina *et al.* (2000) também evidenciaram que, além da proliferação de neuroblastos, algumas células de Kenyon recém-diferenciadas passavam pelo processo de apoptose. A morte dessas células de Kenyon pode indicar tanto um ajuste na quantidade desses neurônios entre as diferentes classes de indivíduos quanto a eliminação de células que se diferenciaram de maneira inadequada.

Os cálices dos corpos pedunculados, formados pelos dendritos das células de Kenyon, apresentam maior profundidade nas operárias recém-emergidas em comparação com as rainhas e machos na mesma fase. A maior extensão inicial dessas estruturas não apenas sugere um maior número de células de Kenyon, as quais originam essas projeções celulares, mas também representa uma expansão da neurópila. Esse aumento na área da neurópila indica um crescimento mais significativo da arborização das células de Kenyon dentro do cálice e do pedúnculo, resultante do desenvolvimento de novos processos neurais dessas células ou da combinação de todos esses eventos. Essas condições têm o potencial de modificar o número de sinapses estabelecidas pelas células e estão intrinsecamente ligadas ao processamento de informações pelos corpos pedunculados (Robinson *et al.*, 1997).

A análise das lâminas preparadas neste trabalho permitiu esquematizar as regiões cerebrais a serem medidas e estudadas, com foco em comparar entre os cortes histológicos dos cérebros que receberam injeção de dsGFP e de dsMNB. Ao realizar essa comparação, observou-

se uma marcante disparidade nos núcleos das células Kenyon, tanto nos corpos cogumelares quanto nos corpos pedunculares. Nos cérebros do grupo dsGFP (controle), os núcleos das células Kenyon apresentavam uma descondensação considerável, enquanto os corpos pedunculares estavam estruturados. Por outro lado, nos cérebros do grupo dsMNB (tratado), os núcleos das células Kenyon exibiam uma condensação significativa, e os corpos pedunculares mostravam-se fenestrados. A condensação cromatínica apresentada pelas células cerebrais das pupas tratadas sugere diminuição de atividade transcricional, potencialmente responsável por processos normais de desenvolvimento. Esta observação pode ser o resultado de níveis baixos da atividade quinase mediada pela proteína *minibrain*, que pode ter como alvo membros da maquinaria de regulação do ciclo celular. A maior ativação do receptor de ecdisona em operárias está relacionada à regulação positiva de um conjunto de genes que governam a proliferação celular, entre eles *minibrain*, que também apresenta altos níveis de expressão durante o desenvolvimento dos lobos ópticos/retina (Marco Antonio e Hartfelder, 2017).

Devido à sua função molecular, *mnb* foi relatado como tendo um amplo repertório de substratos, desde fatores de transcrição e tradução, proteínas do citoesqueleto, receptores de membrana e reguladores da dinâmica da membrana (Lepagnol-Bestel *et al.*, 2009; Shaikh *et al.*, 2016; Tejedor e Hämmerle, 2011; Yang *et al.*, 2016). Por exemplo, no cérebro larval de *Drosophila*, *mnb* regula a expressão de fatores de transcrição que são reguladores-chave da auto-renovação, proliferação e diferenciação terminal de células progenitoras neurais (Shaikh e Tejedor, 2018).

Posteriormente, procedeu-se às medições das diferentes regiões cerebrais analisadas, calculando os volumes correspondentes. Os resultados revelaram diferenças significativas nos volumes do tecido nervoso total, corpo cogumelar, cérebro e lobo óptico ao comparar os grupos dsGFP (controle) e dsMNB (tratado). Essas regiões afetadas são responsáveis majoritariamente pelas funções sensoriais, processamento visual e memória. As abelhas operárias possuem a capacidade de aprender e memorizar características visuais, como formas, padrões, orientação, direção, contraste, intensidade luminosa, profundidade e movimento. Essas habilidades são cruciais para o processamento de cenas visuais complexas, bem como para o controle do voo e a utilização de coordenadas visuais na exploração de locais de interesse, destacando-se as flores e a colmeia (Giurfa e Lehrer 2001; Srinivasan 1994). Essa evidência sugere que os indivíduos submetidos ao tratamento apresentaram uma redução no volume cerebral. Tais conclusões indicam claramente que o gene *mnb* desempenha um papel crucial no desenvolvimento cerebral das operárias durante o período pupal. Considerando que as regiões que se mostraram menores

nas pupas tratadas encontram-se comparativamente menos desenvolvidas em cérebros de rainhas adultas, nossos resultados apoiam a hipótese de que *mnb* é um dos genes fundamentais no desenvolvimento cerebral diferencial entre as castas de *A. mellifera* (Barchuk *et al.*, 2017; Paula *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2021ab).

Nos estudos conduzidos por Paula *et al.* (2021), foi constatado que o gene *mnb* apresenta níveis mais elevados de transcrição no cérebro de operárias durante todo o período de desenvolvimento pupal. A expressão elevada do gene repressor de apoptose (*mnb*) no cérebro de operárias, em conjunto com a expressão intensificada do gene promotor de apoptose no cérebro das rainhas (*caspase-1*), configura um sistema provavelmente responsável pela geração do dimorfismo cerebral adulto identificado nas abelhas.

Análises por RNA-Seq de amostras de RNA de pupas de abelhas tratadas (dsMnb) e controle (dsGFP) realizadas paralelamente a nossos estudos revelaram perfis transcricionais específicos, com 226 genes expressos diferencialmente, 101 *upregulated* em dsMnb e 124 *upregulated* em dsGFP. As funções moleculares mais afetadas pelo *knockdown* incluem fundamentalmente os transportes celulares mediados por membranas (Martins *et al.* submetido). Desde que diversos transportadores de membrana (envolvidos no transporte de aminoácidos, glicose, peptídeos e diversos íons) são dependentes de eventos de fosforilação (Lang *et al.*, 2014), as células de pupas *knockdown* deveriam seus fenótipos à diminuição de processos de incorporação de moléculas indispensáveis para o crescimento e proliferação. Esta condição explicaria o observado menor desenvolvimento de regiões cerebrais em abelhas tratadas, cujos fenótipos lembram os encontrados em pupas de rainhas (Barchuk *et al.*, 2017; Paula *et al.*, 2021).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa apoiam a hipótese sobre o papel fundamental do gene *mnb* no desenvolvimento diferencial do cérebro adulto entre abelhas rainhas e operárias de *A. mellifera*. A comparação entre análises moleculares realizadas em diferentes momentos do desenvolvimento pupal indicou um processo dinâmico de silenciamento e recuperação do gene *mnb*.

Após a administração de injeções de dupla fita, constatou-se, por meio de análises histológicas, uma redução no desenvolvimento cerebral, em resposta à diminuição dos níveis de transcritos do gene *mnb* disponíveis para tradução. Este achado enfatiza a relevância crucial do gene *mnb* no processo de desenvolvimento cerebral das abelhas operárias de *A. mellifera*, contribuindo para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes à morfogênese cerebral.

O método de entrega do dsRNA utilizando injeção na região cefálica, visando a precisão no local de tratamento, provou ser eficaz e inócuo, o que foi corroborado pela evidência de que esse método não causou danos teciduais significativos, conforme atestado pelos grupos de controle. Isso valida a eficácia do método e contribui para a compreensão mais aprofundada das implicações do *knockdown* genético no desenvolvimento neural das abelhas.

Por fim, as análises morfológicas, destacam a complexidade e a sensibilidade do desenvolvimento cerebral durante o período pupal. Os resultados fornecem um alicerce sólido sobre o papel fundamental do gene *mnb* no desenvolvimento cerebral das abelhas *A. mellifera*, contribuindo assim para o entendimento mais amplo da neurobiologia desses importantes polinizadores.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, G.; PERRIMON, N.; NOSELLI, S. The retinoic-like juvenile hormone controls the looping of left-right asymmetric organs in *Drosophila*. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 11, p. 2397-2406, 2003.
- ARAUJO, R. N.; SANTOS, A.; PINTO, F. S.; GONTIJO, N. F.; LEHANE, M. J.; PEREIRA, M. H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 683-693, 2006.
- ARONSTEIN, K.; OPPERT, B.; LORENZEN, M. D. RNAi in Agriculturally Important Arthropods. In: GRABOWSKI, P. (Org.). **RNA Processing**. Rijeka: InTech, p. 157-180, 2011.
- AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 20, p. 10-20, 2023. DOI: 10.7594/revbio.20.01.10.
- BARCHUK, A. R. *et al.* Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, Londres, v. 7, n. 1, p. 70, 2007.
- BARCHUK, A. R.; FIGUEIREDO, V. L.; SIMÕES, Z. L. Downregulation of ultraspiracle gene expression delays pupal development in honeybees. **J Insect Physiol.**, Oxford, v. 54, n. 6, p. 1035-1040, jun. 2008. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.04.006.
- BARCHUK, A. R. *et al.* The ontogenetic saga of a social brain. **Apidologie**, Paris, v. 49, n. 1, p. 32-48, 2018.
- BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honeybee. **Bee World**, Londres, v. 60, p. 24-39, 1979.
- BEYE, M.; HARTEL, S.; HAGEN, A.; HASSELMANN, M.; OMHOLT, S. W. Specific developmental gene silencing in the honeybee using a homeobox motif. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 11, p. 527-532, 2002.
- BEYE, M.; HASSELMANN, M.; FONDRK, M. K.; PAGE, R. E.; OMHOLT, S. W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. **Cell**, Cambridge, v. 114, p. 419-429, 2003.
- CORONA, M. *et al.* Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honeybee longevity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 104, n. 17, p. 7128-7133, 2007.
- CORONA, M.; ESTRADA, E.; ZURITA, M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. **Journal of Experimental Biology**, Londres, v. 202, n. 8, p. 929-938, 1999.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP,

2009.

ELBASHIR, S. M.; MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 20, n. 23, p. 6877-6888, 2001.

DE PAULA JUNIOR, D. E.; DE OLIVEIRA, M. T.; BRUSCADIN, J. J.; PINHEIRO, D. G.; BOMTORIN, A. D.; COELHO JÚNIOR, V. G.; BARCHUK, A. R. Caste-specific gene expression underlying the differential adult brain development in the honeybee *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, Oxford, v. 30, n. 1, p. 42-56, 2001.

DI VONA, C. *et al.* Chromatin-wide profiling of DYRK1A reveals a role as a gene-specific RNA polymerase II CTD kinase. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 57, n. 3, p. 506-520, 2015.

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

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

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, Londres, v. 391, p. 806-811, 1998.

FOTAKI, V. *et al.* Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. **Molecular and Cellular Biology**, Barcelona, v. 22, n. 18, p. 6636-6647, 2002.

GALETTO, L. A. S.; ROSSI, M.; RIPAMONTI, M.; PALMANO, S.; BOSCO, D.; MARZACHÌ, C. Silencing of ATP synthase  $\beta$  reduces phytoplasma multiplication in a leafhopper vector. **J Insect Physiol.**, Oxford, v. 128, 104176, 2021. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2020.104176. PMID: 33253714.

GIURFA, M.; LEHRER, M. Honeybee vision and floral displays: from detection to close-up recognition. In: CHITTKA, L.; THOMSON, J. (Orgs.) **Cognitive ecology of pollination**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 61-82, 2001.

GROH, C.; AHRENS, D.; RÖSSLER, W. Environment- and age-dependent plasticity of synaptic complexes in the mushroom bodies of honeybee queens. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v. 68, n. 1, p. 1-14, 2006.

GROH, C.; RÖSSLER, W. Caste-specific postembryonic development of primary and secondary olfactory centers in the female honeybee brain. **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 37, n. 6, p. 459-468, 2008.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology**. Londres: Chapman & Hall, 1994.

GUO, X.; WANG, Y.; SINAKEVITCH, I.; LEI, H.; SMITH, B. H. Comparison of RNAi knockdown effect of tyramine receptor 1 induced by dsRNA and siRNA in brains of the honeybee, *Apis mellifera*. **J Insect Physiol.**, Oxford, 2018.

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

HUNTER, T. A thousand and one protein kinases. **Cell**, San Diego, v. 50, n. 6, p. 823-829, 1987.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 1A-149A, 1965.

KETTING, R. F.; HAVERKAMP, T. H.; VAN LUEENEN, H. G.; PLASTERK, R. H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. **Cell**, Cambridge, v. 99, p. 133-141, 1999.

LAGUNA, A. *et al.* The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 15, n. 6, p. 841-853, 2008.

LANG, F.; FÖLLER, M. Regulation of ion channels and transporters by AMP-activated kinase (AMPK). **Channels (Austin)**, Austin, v. 8, n. 1, p. 20-28, 2014. DOI: 10.4161/chan.27423.

LEPAGNOL-BESTEL, A. M. *et al.* DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1405-1414, 2009.

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

MANNING, G. *et al.* The protein kinase complements of the human genome. **Science**, New York, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, 2002.

MARCO ANTONIO, D. S.; HARTFELDER, K. Toward an Understanding of Divergent Compound Eye Development in Drones and Workers of the Honeybee (*Apis mellifera* L.): A Correlative Analysis of Morphology and Gene Expression. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, New York, v. 328, n. 1-2, p. 139-156, 2017. DOI: 10.1002/jez.b.22696.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963.

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

MODA, L. M. *et al.* Nutritionally driven differential gene expression leads to heterochronic brain development in honeybee castes. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. e64815, 2013.

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

- NIJHOUT, H. F. When developmental pathways diverge. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 96, p. 5348-5350, 1999.
- O'DONNELL, K. *et al.* DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 583-595, 2015.
- O'DONNELL, K. *et al.* Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, Amsterdam, v. 52, p. 20-31, 2013.
- PRENTICE, K. *et al.* RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae). **Pest Manag Sci.**, Oxford, v. 73, n. 1, p. 44-52, 2017. DOI: 10.1002/ps.4337. PMID: 27299308.
- ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, C. Temporal and morphological differences in postembryonic differentiation of the mushroom bodies in the brain of workers, queens, and drones of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 1171-1178, 2008.
- ROAT, T. C.; DA CRUZ LANDIM, C. Differences in mushroom bodies morphogenesis in workers, queens and drones of *Apis mellifera*: Neuroblasts proliferation and death. **Micron**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 382-389, 2010a.
- ROAT, T. C.; LANDIM, C. Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honeybee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 35, n. 3, p. 415-425, 2010b.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (2ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SHAIKH, M. N.; GUTIERREZ-AVIÑO, F.; COLONQUES, J.; CERON, J.; HÄMMERLE, B.; TEJEDOR, F. J. Minibrain drives the Dacapo-dependent cell cycle exit of neurons in the *Drosophila* brain by promoting *asense* and *prospero* expression. **Development**, Cambridge, v. 143, n. 17, p. 3195-3205, 2016. DOI: 10.1242/dev.134338.
- SHAIKH, M. N.; TEJEDOR, F. J. Mnb/Dyrk1A orchestrates a transcriptional network at the transition from self-renewing neurogenic progenitors to postmitotic neuronal precursors. **Journal of Neurogenetics**, Abingdon, v. 32, n. 1, p. 37-50, 2018. DOI: 10.1080/01677063.2018.1438427.
- SRINIVASAN, M. V.; ZHANG, S. W.; WITNEY, K. Visual discrimination of pattern orientation in honeybees: Performance and implications for "cortical" processing. **Philos Trans R Soc B**, London, v. 343, p. 199-210, 1994.
- SONG, W. *et al.* Isolation of Human and Murine Homologues of the *Drosophila* Minibrain Gene: Human Homologue Maps to 21q22.2 in the Down Syndrome "Critical Region". **Genomics**, San Diego, v. 38, n. 3, p. 331-339, 1996.
- SOPPA, U.; BECKER, W. DYRK protein kinases. **Current Biology**, London, v. 25, n. 12, p. R488-R489, 2015.

TEJEDOR, F. *et al.* minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. **Neuron**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 287-301, 1995.

TEJEDOR, J.; HÄMMERLE, B. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 278, n. 2, p. 223-235, 2011.

VIEIRA, J. *et al.* Molecular underpinnings of the early brain developmental response to differential feeding in the honeybee *Apis mellifera*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Gene Regulatory Mechanisms**, Amsterdam, v. 1864, n. 9, art. 194732, 2021.

WILSON, E. O. One giant leap: how insects achieved altruism and colonial life. **BioScience**, Washington, DC, v. 58, p. 17-25, 2008.

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

YANG, L. *et al.* Minibrain and Wings apart control organ growth and tissue patterning through down-regulation of Capicua. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 113, n. 38, p. 10583-10588, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1609417113.

**ANEXO A - Sequência do mRNA de *mbn* mostrando o fragmento de 543 nt utilizado nos ensaios de RNAi (entre as sequências de *primers*, sublinhadas) (A) e sequência de aminoácidos mostrando o domínio PK (proteína-quinase) incluído no fragmento (B).**

(A) >XM\_026446404.1 PREDICTED: *Apis mellifera* serine/threonine-protein kinase minibrain (LOC409111), mRNA

ATGGAGTATGGAAGCGGCGGGGTGGAGGCGGTGGGGCCGTGGGGGTGTCCAACCACCCTCTGCAGGTG  
 CGAGGGGTATGGCGGGAACAGACACTACTGATGCTGCATGGCACAAACACGAACAAATGATCCTTATGGA  
 ATCCAGGCATAAGCAACAACCTAAGCGGAAGAACAGGTGCAGGTGGAGGTGGTGGTGGAGGCGGTGGTGCA  
 CCTCTTTACGGTCGTCTAGTAGCTGAGGAGCCATTACCTCCCACAGTATGTGGTGGTACCAGGTACCAGGTG  
 GCGGTACCAGGTGGGATCCCACAAGAAACCCCGCGGATATACATGCCATGCAAGCTAGGATACCCCATAG  
 GTTTCGTGATCCAGCTACAGCACCTCTTAGGAACTTAGTGTAGATCTCATCAAACCTTACAAGCACATC  
 AACGAGGTTTATTATGCTAAGAAAAAAGGAGGGCGCAACAAATGCAAGGAGAAGATGGTTCCCATAAAA  
 AAGAAAGAAAATTGTACAACGATGGTTGGGATGATGATAATCATGATTATATTATCAAGAATGGGGAAAA  
 GTTCCTCGATCGTTATGAGATCGATTTCGCTAATAGGTAAGGCAGTTTTGGCCAAGTAGTAAAAGCGTTT  
 GATCATGAAGAACAACGCAAGTGGCAATAAAAATTATCAAGAACAACAACTTTTCTAAATCAAGCGC  
 AAATCGAAGTGAGGCTATTGGAAATGATGAACAGGGCGGATACCGACAACAAATATTATATAGTTAAACT  
 AAAAAGGCATTTTATGTGGCGAAATCATTATGTCTGGTATTCGAACTGTTATCATATAATCTGTATGAT  
 CTACTTAGAAAATACAAATTTTCGAGGAGTGCATTGAACTTAACAAGGAAGTTTGCACAGCAACTGTGTA  
 CTGCCCTTTTGTTCCTGTCTACACCGAATTGAACATCATTCACTGTGATCTGAAACCTGAAAACATACT  
 TTTGTGCAATCCCAAACGAAGTGCATAAAAAATAGTAGATTTTGGTAGTTCGTGTCAACTTGGACAAAGA  
 ATATATCAGTATATTCAATCCAGGTTTTATCGATCTCCTGAAGTCTTATTAGGAATACCTTATGACCTTG  
 CGATAGACATGTGGAGTCTAGGATGTATTTTAGTTGAAATGCATACGGGAGAACCCTCTATTTAGTGGGGC  
CAACGAGGTCGATCAAATGAATAAAATCGTAGAAGTATTAGGAATGCCACCGAAACATATATTGGACCAA  
 GCGCATAAGGCGCGGAAATACTTTGACAAAGTCCCACGGATGGCTCGTATGTGCTGAAAAAGTCAAAGG  
 ATGGTAAAAAGTACAAACCTCCTGGTACAAGACGCTTACATGATATCTTAGGTGTGAAAGCGGAGGCC  
 TGGTGGTAGAAGGATAGGTGAACCTGGTCATTCAATTTCTGATTACCTCAAATTTAAAGACTTGATTCTG  
 CGAATGTGGATTTTGTATCCAAAAACAAGAGTGACCCGTATTATGCACTTCAGCACAAATTTCTTTAAAC  
 GAACAGCCGATGAGGGACCAACACGAATATTGCTGCTGCCAATAGTGCTAACACGAGCCCGCAGTAGT  
 ATCGATGAGCCAAGATCATGGACTGGTAACCATGTCAGGACAGGGAAGCAACAACAGTGGCAATCCGATG  
 CAAATATCAAGTCTCCCTGGTGGCTATCAGCCTATGGAGTGCATTATCGCCTCGTCATTTAGGGAATC  
 GACGTGTGTAACAACAACTATCCGTCAACTTCGGCCACTGGGGTGTCTGCATCCGGGCGGATGTCCAT  
 GCAATCTGTAGACAGTTCCTGATACAAAGCTCTCTTGGATCGTATAATAGCCTAATTCTCCCTGGTATA  
 TCCCATCTGCCTGCGATGATGACCTCACCAATGATTACAGCAGCAGAACTTTTACAATTATGGTTATTCAA  
 CGACTGATGCGCACGGAATAGTCAGACAACCGTCGACAGTCTCAACCGGTAACAAAGAGATCCGGAAAG  
 AGAAGATAGTCTTATGGTTGGAGTATGCGTCCAGCAGAGTCCAGTTGCTATTCACTGAAACGAAAAGAAA  
 TAAAAAGAACTACGACGACGATCGATACGTATTGTCGTACGATAGCGGTACCGTCAAAAAATATATATTA  
 GGTGATTATATATACTGTATATACAAAGTTCATGATGATACCACAAAACCTGTTGTACTGTTTATGAAAA  
 GAAAAAAGAAAGGAAATGAGAACGGGAAATAGGAAAAGTCCTTCCCTGTTGCATTGCTTTGCATTT  
 CATCGTTTTGTTGTCTACAAAAA

(B)

PLFSGANEVDQMNKIVEVLGMPPKHILDQAHKARKYFDKVP TDGSYVLKKS KDGK KYKPPGTRRLHDILGVE SGGPG  
 GRRIGEPGHSISDYLFKFDLILRMLDFDPKTRVTPYYALQHNF FKR TADEGTNTNIAAANSANTSPAVVSMSQDHGLVTMSGQ  
 GSNNSGNPMQISSLPGGYQPM



(elaborado utilizando a seguinte ferramenta:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)