



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós Graduação em Genética e Bioquímica

**Padrão de Heterocromatina em *corpora allata* de
Melipona scutellaris (Apidae, Meliponini)**

Aluno: Naiara Araújo Borges

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Uberlândia-MG

2014



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós Graduação em Genética e Bioquímica

**Padrão de Heterocromatina em *corpora allata* de
Melipona scutellaris (Apidae, Meliponini)**

Aluno: Naiara Araújo Borges

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Dissertação apresentada
à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética).

Uberlândia-MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B732p Borges, Naiara Araújo, 1991-
2014 Padrão de heterocromatina em corpora allata de *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini) /Naiara Araújo Borges -- 2014.

77f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.
Coorientador: Carlos Ueira Vieira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Génetica - Teses. 2. *Melipona* - Teses. 3. Abelha sem ferrão - Teses. 4. Heterocromatina - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Vieira, Carlos Ueira, 1981- III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós Graduação em Genética e Bioquímica

**Padrão de Heterocromatina em *corpora allata* de
Melipona scutellaris (Apidae, Meliponini)**

Aluno: Naiara Araujo Borges

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr^a Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores: Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo/ FACOM /UFU
Dr^a. Gislene Almeida Carvalho-Zilse / INPA, Manaus-AM

Data da Defesa: 29 / 07 / 2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Ana Maria Bonetti



Dedicatória

*A Deus,
por me amparar e guiar nos períodos de cansaço e desespero, me
agraciar com paciência e me conduzir na vida com fé e amor.*

*À minha família,
pelo amor incondicional e esperança em minha capacidade e
formação, revelando que na vida, muitas serão as atribulações, mas a
derradeira jornada reserva uma recompensa inestimável. Amo muito vocês.*

*À minha orientadora,
por participar do meu desenvolvimento profissional e pessoal.*

Dedico.

*Em homenagem a Warwick Estevam Kerr...
Sempre nosso grande MESTRE*



Agradecimentos

Finalizando essa importante etapa, de alegrias, descobertas e aprendizado, muitas pessoas se fizeram presentes, demonstrando apoio, ânimo e realizando críticas construtivas. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu alcançasse com sucesso o término dessa jornada - venho deixar - formalmente expresso, meus sinceros e inesquecíveis agradecimentos.

Agradeço, sempre, a *Deus*, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, iluminar meu caminho e me suprir em todas minhas necessidades;

Ao meu pai *João Alberto*, meu eterno agradecimento pelo apoio e confiança, por estar sempre torcendo para que meus objetivos sejam alcançados, em especial pelas broncas, ao sentir falta de minha presença e companheirismo;

À minha mãe *Elca*, por ser tão dedicada e amiga, por ser a pessoa que sempre acredita na minha capacidade, meu agradecimento por ficar continuamente ao meu lado e nunca me deixar desistir na busca dos sonhos;

Ao meu namorado, *Gustavo*, que no fim dessa fase, demonstrou sempre estar a meu lado, com paciência, carinho e amor, compreendendo momentos de tensão e apoiando minhas decisões.

A minha incomparável Mestra, Prof. Dra. *Ana Maria Bonetti*, parafraseando o texto do poeta e pensador, “Vós sois as flores e nós as abelhas. Entregastes o néctar do conhecimento e da orientação. Nós em troca oferecemos gratidão e reconhecimento.” Agradeço os ensinamentos e puxões de orelha, visando sempre minha formação profissional e meu crescimento pessoal, edificando apropriadamente uma Pesquisadora;

Aos meus amigos do Laboratório de Genética, com quem compartilhei além de técnicas moleculares, aprendizado em um ambiente de confiança e grande amizade. Em especial, à minha mais que amiga, conselheira e irmã, *Ana Carolina*; às companheiras de momentos únicos, *Natália* e *Emília*; às amigas mais singelas e meigas, *Rafaela* e *Luana*; aos que provaram a amizade verdadeira entre homens e mulheres, *Carlos Jr.*, *Célio*, *Denis* e *Washington* e demais amigos que no dia a dia destacaram-se pela preocupação e boas conversas *Andressa*, *Cassio*, *Isabel*; *Patricia Terra*; *Patrícia Tieme*; *Pedro Henrique*;

Aos amigos de outros Laboratórios, que me ensinaram a importância do bom relacionamento e pela ajuda no desenvolvimento de tal trabalho;

Ao Prof. Dr. Bruno Travençolo, pela valiosa e direta orientação nas análises de reconstrução computacional, com atenção e empenho;

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira, pelo apoio e conselhos durante o desenvolvimento do trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcelo Beletti pelas facilidades para utilização do microscópio confocal e material do Laboratório de Análise de Imagens/ICBIM;

À técnica Mariani Borges, pela disposição e colaboração na utilização do microscópio confocal e captura das imagens;

À Marcela Bezerra Laure por nos ter ensinado a técnica de dissecção de *corpora allata*, imprescindível para a realização desse trabalho;

Aos Professores do Instituto de Genética e Bioquímica /INGEB, que com seus ensinamentos disponibilizados em aulas e o contato diário nos corredores do Instituto contribuiram para a meu crescimento intelectual;

Aos técnicos e secretários do INGEB, pela cordialidade e convivência amiga;

Às minhas amigas de longa data, Ana Laura Passos, Ana Letícia Strona, Carla Borges, Déborah Pereira, Flávia Campos, Letícia Eulálio, Mariana Zoia, Melina Galdiano, Nicole Ladir, Paula Santos e Rafaela Silva, por instantes de conversas e momentos de distração durante o desenvolvimento do trabalho;

Aos Tios, Tias, Primos e Primas, cada um de meus *familiares e amigos*, que sempre depositaram fé em meu futuro, pelo desvelo e compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, minha eterna gratidão.

À Universidade Federal de Uberlândia pela minha formação na graduação e pós graduação;

À agencia FAPEMIG pelo auxílio vinculado ao Projeto FAPEMIG APQ-01024-12 concedido à orientadora;

À agencia CNPq pela bolsa de mestrado;

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e FAU/UFU pelo auxilio concedido ao Programa e gestão financeira dos projetos.

Os momentos mais esplêndidos da vida não são os chamados dias de êxito. Mas sim, aqueles dias em que saindo do desânimo e do desespero, sentimos erguer-se dentro de nós um desafio: a vida e a promessa de futuras realizações. Cabe a cada um agora, a iniciativa de trilhar o seu caminho. Cabe a cada um de nós a coragem de assumir a própria escolha.

Gustave Flaubert



Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1	3
Fundamentação Teórica	3
1 Melipona: Aspectos Gerais	4
2 Melipona: Determinação de Casta.....	6
3 Hormônio Juvenil e Expressão Gênica em Insetos	9
4 Epigenética: Implicações na Expressão Gênica	10
5 Epigenética: Estudos em Abelhas e outros Insetos.....	14
6 Referências Bibliográficas	16
Capítulo 2	27
Padrão de Heterocromatina em corpora allata de <i>Melipona scutellaris</i> (Apidae, Meliponini)	27
1. Resumo	28
2. Abstract.....	29
3. Introdução.....	30
4. Objetivos	33
4.1. Objetivo geral	33
4.2. Objetivo Específico.....	33
5. Material e Métodos	34
5.1. Material Biológico	34
5.2. Indução de Rainhas por tratamento com Hormônio Juvenil (HJ)	35
5.3. Obtenção dos corpora allata.....	36
5.4. Microscopia Confocal	36
5.5. Montagem de imagem	36
5.6. Análise estatística.....	38
6. Resultados	39
7. Discussão	48
8. Conclusões	57
9. Reférencias Bibliográficas	58



Apresentação

O presente trabalho apresenta uma revisão da literatura sobre aspectos gerais da abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, a ação do Hormônio Juvenil em insetos, a função das glândulas *corpora allata* e o papel da heterocromatina na regulação da expressão gênica. Em seguida, descrevemos a análise por microscopia confocal com reconstrução computacional, do padrão da heterocromatina em núcleos de células dos *corpora allata* de *Melipona scutellaris*.



Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1 Melipona: Aspectos Gerais

A ordem Hymenoptera, um dos maiores grupos dentre os insetos, compreende vespas, abelhas e formigas. Possui cerca de 115 000 espécies descritas, nas quais destacam-se as abelhas com alta complexidade de organização social. As abelhas sem ferrão pertencem a Ordem Hymenoptera, Subordem Apocrita, Superfamília Apoidea, Família Apidae, Subfamília Apinae e Tribo Meliponini, essa última, incluindo todas as abelhas sem ferrão (Michener, 2007). Segundo esse autor, já foram descritas cerca de 423 espécies de abelhas, distribuídas em 24 gêneros.

A espécie objeto do presente estudo é a *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). O gênero *Melipona* apresenta cerca de 40 espécies, desde o México até a Argentina, com ampla distribuição na bacia amazônica. Geograficamente, *Melipona* ocupa regiões tropicais de todo mundo (com poucas exceções) estendendo-se, no sul, para regiões temperadas e ao norte, até perto do Trópico de Câncer (Michener, 2007). No Brasil, a espécie *Melipona scutellaris* ocorre (Figura 1) nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe (Camargo & Pedro, 2013).



Figura 1. Estados do Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe) de ocorrência natural de *Melipona scutellaris*. Fonte: Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region—online version Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> . Acesso Maio 2014.

As abelhas do gênero *Melipona* constroem células de cria (alvéolos) em favos horizontais ligados por pilastras de cera e, separadamente, potes de cera ovalados, para armazenamento de pólen e mel. As células de cria, para postura dos ovos, são abastecidas com alimento, que consiste de uma mistura de pólen, secreção glandular, néctar ou mel, de textura semi-líquida, colocado integralmente na célula de cria antes da postura, processo conhecido como alimentação massal. Sobre o alimento, o ovo é posicionado verticalmente e, em seguida, a célula é operculada por uma operária, sendo aberta apenas para a eclosão do imago. Após a eclosão, a célula é destruída, não sendo reusada como em *Apis*. O desenvolvimento larval prossegue sem alimentação suplementar e contato com outras abelhas da colônia, diferentemente da alimentação progressiva, encontrada nas abelhas africanizadas, onde as operárias alimentam as larvas, por várias vezes, durante seu desenvolvimento inicial (Kerr & Nielsen, 1966; Kerr et al., 1996).

Os machos de abelhas têm como função fecundar as rainhas jovens. Em *Melipona*, eles permanecem na colmeia durante o primeiro terço de vida e já foram vistos trabalhando no aquecimento de cria, produção e manipulação de cera e coleta de pólen nas flores (Kerr *et al.*, 1996).

2 *Melipona*: Determinação de Casta

Os Meliponini compartilham com todas as abelhas da família Apidae a condição de eusocialidade, a qual pressupõe a existência de castas, divisão de tarefas, sobreposição de gerações e cuidados com a prole (Wilson, 1971; Michener, 2000).

Em uma colônia são encontradas, convivendo, duas castas: as rainhas, fêmeas férteis, que possuem como funções a reprodução e a manutenção da coesão dos indivíduos da colônia por meio de produção de feromônios; e as operárias, fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis por atividades de manutenção da colmeia como limpeza, cuidado com a prole, defesa, forrageamento e, eventualmente, postura de ovócitos que darão origem a machos (ovos reprodutivos) ou alimentarão a rainha (ovos tróficos) (Velthuis *et al.*, 2001; Cruz-Landim, 2009).

Além de diferenças comportamentais, rainhas e operárias se distinguem morfológicamente pelo tamanho da cabeça, dos olhos compostos, forma do clípeo, cor do corpo, volume da espermateca, ocorrência de glândulas tergais e outras (Bonetti, 1984; Bonetti *et al.*, 1994). As operárias possuem corbícula, uma estrutura adaptada à coleta de pólen, localizada na tibia do terceiro par de pernas; possuem espermateca reduzida e ovários, que apesar de apresentarem o mesmo número de ovaríolos do que nas rainhas, são menos desenvolvidos do que os delas (Michener, 1974, 2000; Bonetti, 1982, 1984; Bonetti *et al.*; 1994).

A determinação de castas nos Hymenoptera ocorre, de forma geral, via alimentação diferencial da larva (Kerr & Nielsen, 1966).

Em *Apis mellifera*, o dimorfismo depende do regime alimentar; as larvas que darão origem às rainhas são alimentadas durante todo o desenvolvimento larval

com geléia real e as larvas destinadas a serem operárias, recebem até o terceiro dia de vida, geléia real, a qual é substituída posteriormente por uma mistura de mel, pólen e secreções das glândulas hipofaringeanas, comumente denominada de “geléia das operárias”. As larvas de *A. mellifera* são alimentadas progressivamente pelas operárias nutridoras e variação na quantidade e qualidade do alimento é responsável pela produção de rainha ou operária (Haydak, 1970; Beetsma, 1979; Maleska, 2008; Miklos & Maleszka, 2011).

Em algumas espécies de indivíduos da Tribo Meliponini a quantidade de alimento recebida pela larva é o fator crítico para a determinação das castas. Há diferença no tamanho das células de cria, sendo que nas maiores, que possuem o dobro ou triplo do alimento larval em relação a uma célula normal, são produzidas as rainhas e nas outras, de menor tamanho, nascem operárias e machos (Camargo, 1972; Campos, 1979; Hartfelder & Engels, 1988).

Em *Frieseomellita varia* (Meliponini) onde o estímulo alimentar é o desencadeador da produção de rainhas, as células de cria são todas do mesmo tamanho e as larvas que darão origem a rainhas perfuram a célula vizinha, matam a larva presente nela e comem o alimento extra (Terada, 1974; Faustino et al., 2002).

Nos Meliponini, o mecanismo trofogênico é o que predomina na determinação de castas. As abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* representam uma exceção a essa regra, pois nessas abelhas a quantidade e qualidade do alimento larval não são suficientes para a diferenciação em rainha ou operária (Kerr et al., 1996; Camargo et al., 1976; Bonetti, 1983). A determinação de castas em *Melipona* baseia-se em um mecanismo que envolve componente genético (dois genes) associado a componente ambiental (alimento). Operárias e rainhas de *Melipona* emergem de células de cria do mesmo tamanho, com a mesma quantidade e qualidade de alimento (Kerr, 1946, 1948, 1950, 1974, 1975, 1976; Kerr et al., 1966; Kerr & Nielsen, 1966; Bonetti, 1983; Bonetti et al., 1995).

Dentre as larvas, igualmente alimentadas, até 25% do total de fêmeas podem se desenvolver em rainhas (Kerr, 1950) conforme mostra a Figura 2.

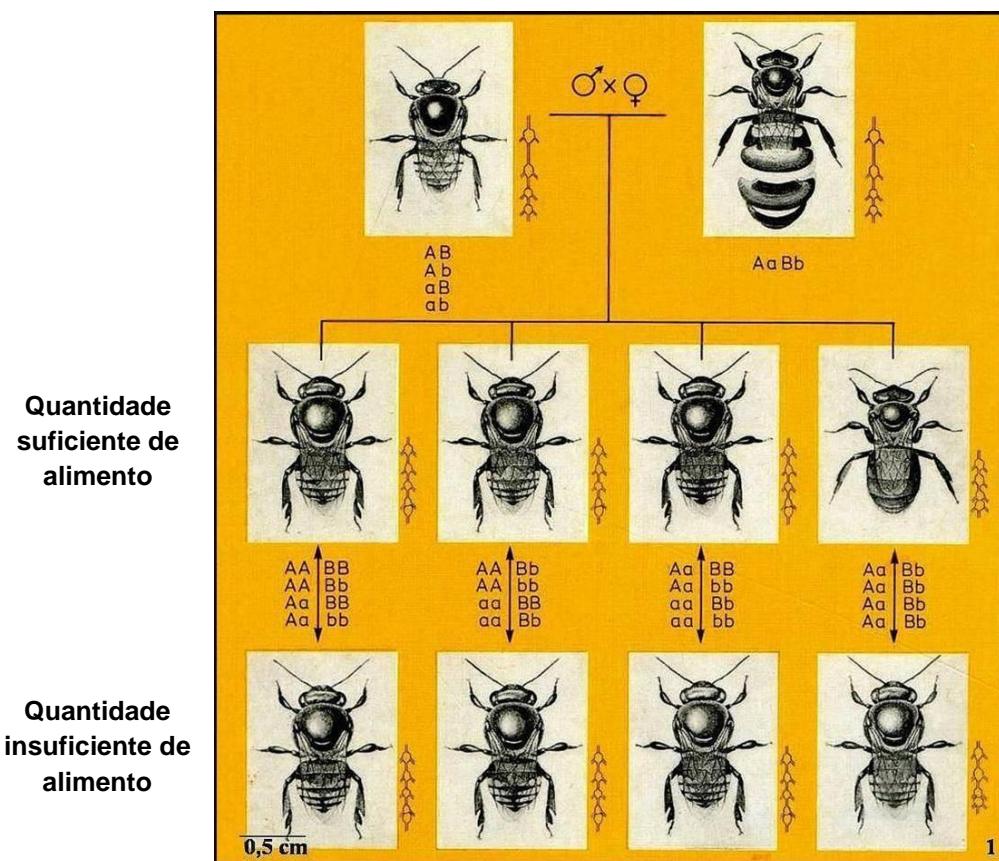


Figura 2. Determinação de Casta em *Melipona quadrifasciata*. Fonte: CIÊNCIA E CULTURA 25 (10) Outubro 1973 (Capa e Artigo “Genética e Biologia de Abelhas”)

A dupla heterozigose dos genes responsáveis pela produção de fêmea completa e a quantidade de alimento insuficiente leva à produção de fenótipos, isto é, fêmeas com fenótipo de operárias e características morfológicas internas de rainha (Cruz-Landim et al., 1980) (Figura 2).

3 Hormônio Juvenil e Expressão Gênica em Insetos

O Hormônio Juvenil (HJ) faz parte de um grupo de hormônios sesquiterpenóides acíclicos, constituído em uma extremidade da molécula por um grupo *epoxide* e, na outra, por *methyl ester* (Roller et al., 1967).

Nos insetos, sua síntese ocorre basicamente nos *corpora allata*, glândulas endócrinas localizadas em ambos os lados do esôfago, perto do cérebro (Snodgrass, 1956; Wigglesworth, 1970; Gilbert et al., 2000; Lattorff & Moritz, 2013).

Abordagens que utilizam a aplicação de HJ e estudo de suas vias de síntese e degradação seguida de análises moleculares indicam expressão gênica-casta específica em *Melipona* (Hartfelder & Engels, 1988; Bonetti et al., 1994, 1995; Evans & Wheeler, 2000; Judice et al., 2004, 2006; Santana et al., 2006; Vieira et al., 2008; Siquieroli et al., 2009) com o propósito de elucidar o mecanismo de determinação e diferenciação de castas nessas abelhas.

O papel do HJ tem sido estudado ao longo de décadas e sua importância tem sido demonstrada na regulação da metamorfose, determinação de castas, comportamento, diapausa, polifenismos, fisiologia (Campos, 1979; Nijhout & Wheeler, 1982; Bonetti, 1983, 1984; Bonetti et al. 1994, 1995, 2006; Gilbert et al., 2000; Gelman et al., 2007; Barchuk et al., 2007).

A embriogênese, o desenvolvimento larval e adulto, a determinação de castas em insetos sociais e a metamorfose assim como o metabolismo em todos os insetos tem o HJ como fator regulador, o que o torna de significante importância para a compreensão dos processos biológicos em insetos (Bonetti, 1984; Hammock, 1985; Hartfelder & Engels, 1988; Barchuk et al., 2002; Barchuk et al., 2007).

Os níveis de HJ são controlados por processos de síntese, degradação e ligação a proteínas específicas na hemolinfa. Neuropeptídeos que controlam a síntese de HJ têm sido identificados em insetos. As alatotropinas estimulam a produção de HJ e as alatostatinas inibem a produção desse hormônio (Taylor et al., 1996).

Precursors biosintéticos de HJ como *Methyl Farnesoate*, *Farnesoic Acid*, *phenoxy-phenyl (phenoxy carb, thiroxine, triiodothyronine)* fitojuvenóides e alguns peptídeos podem funcionar como HJ (Gilbert, 2005).

Em *Melipona* a produção de rainhas pode ser induzida pela aplicação de HJ ou seus análogos (Campos, 1979; Buschini & Campos, 1991; Bonetti et al., 1995) em larvas que recebem o tratamento em estágio de Larva 3 (L3-3) até 75 horas após o início de tecelagem de casulo (Larva Pré-Defecante, LPD) (Bonetti et al., 1994, 1995).

A aplicação de HJ em larvas de *Melipona* causa a feminização da pupa e dos machos adultos haplóides indicando presença de genes feminizantes e de receptores para HJ ou proteínas ligantes nos machos de *M. marginata* e *M. compressipes* (Campos, 1978; Bonetti, 1982). Camargo (1977) verificou o mesmo efeito com a aplicação de HJ em machos diplóides de *M. quadrifasciata*.

Além de papel fundamental na determinação de castas, os níveis de HJ também são responsáveis pelo polietismo etário em abelhas eusociais. Ocorre aumento progressivo nos níveis de HJ na hemolinfa de operárias de *A. mellifera*, que iniciam suas atividades com as tarefas internas na colmeia e terminam realizando atividades de forrageamento. Operárias tratadas com análogo de HJ apresentaram comportamento de forrageamento mais cedo do que o controle e tiveram sua longevidade diminuída (Jaycox et al., 1974; Robinson & Vargo, 1997) assim como as operárias que tiveram o gene da vitelogenina silenciado (Marco Antonio, 2008).

A relação do HJ com o desenvolvimento do comportamento está associada à mudança de função desse hormônio, que passa de regulador de processos reprodutivos para integrador da vida social (Hartfelder, 2000).

4 Epigenética: Implicações na Expressão Gênica

À Conrad H. Waddington é dado o crédito por cunhar o termo epigenética, que usou para descrever eventos que não podem ser explicados por princípios genéticos. Definiu epigenética como “*the branch of biology which studies the*

causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being" (Jablonka & Lamb, 2002).

Literalmente, o prefixo "epi" significa "acima de", "nível acima" e a palavra é definida hoje como "estudo da regulação de genes, sua expressão e como são traduzidos em fenótipos diferentes independente de alteração na sequência de DNA" (Sasaki & Matsui, 2008; Miklos & Maleszka, 2011).

A epigenética nasceu para responder questões sobre como células geneticamente idênticas produzem fenótipos distintos.

Os mecanismos epigenéticos envolvem modificações químicas do próprio DNA, modificações pos-traducionais das proteínas associadas a ele, posicionamento dos nucleossomos ou, ainda, alterações provocadas por micro RNAs não codificantes que em conjunto definem o epigenoma de um organismo (Nelson & Cox, 2011; Chen & Dent, 2014).

Eventos epigenéticos têm sido considerados importantes para o desenvolvimento e estabelecimento da programação correta da expressão gênica e são estudados para a compreensão de processos que envolvem *imprinting* genômico, reprodução humana, imortalidade de células cancerígenas, estabilidade genômica, inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, plasiticodeza cerebral em insetos e expressão gênica de modo geral (Lyko & Maleszka, 2011; Bergman & Cedar, 2013; Hackett & Surani, 2013). Enzimas envolvidas em mecanismos epigenéticos estão entre os importantes alvos farmacêuticos devido ao seu envolvimento em processos celulares e etiologia de doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e desordens de desenvolvimento (revisão em Chen & Dent, 2014).

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos, onde um grupo metil (-CH₃) é ligado, usualmente, à Citosina na molécula de DNA (Figura 3) em dinucleotídeos CpG, por meio de enzimas específicas (Chen et al., 2003; Goll & Bestor, 2005; Jeltsch, 2006; Clouaire et al., 2010; Nelson & Cox, 2011) sem afetar a sequencia de nucleotídeos. É uma modificação do DNA que, quase sempre, está associada à condensação da cromatina e inibição da expressão gênica por inibição da atividade do promotor gênico, contribuindo para a manutenção dos sítios de cromatina silenciada nos eucariotos com genomas complexos (Grewal &

Moazed, 2003). O doador de grupo metil é, geralmente, a *S-adenosyl-L-methionine* (SAM-CH₃) encontrada nas células.

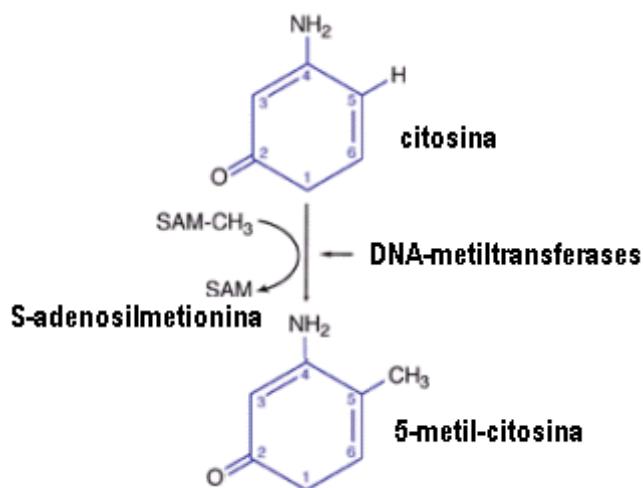


Figura 3: Mecanismo de metilação do DNA. A 5-metil-citosina é produzida pela ação das DNA-metiltransferases que catalizam a transferência de um grupo metil (CH₃) da S-adenosilmetyonina (SAM) para o carbono na posição 5 da Citosina. Fonte: Genética e câncer. Disponível em <http://dc150.4shared.com/doc/rMY3odZX/preview.html>. Accessed May 2014.

Quatro DNA metiltransferases foram observadas em mamíferos: DNMT1, responsável pela manutenção da metilação durante a replicação do DNA, copiando na fita nova o padrão de metilação da fita antiga. DNMT3a e DNMT3b, responsáveis pela metilação *de novo* em sítios CpG não metilados, além de cooperarem com a DNMT1 na propagação da metilação (Liang et al., 2002) e DNMT2, com pequena atividade de DNA metilase e que segundo Goll et al. (2006) funcionaria, primariamente, como RNA metiltransferase, metilando resíduos de citosina do tRNA no citoplasma, indicando uma nova função da DNMT2 na hereditariedade epigenética mediada por RNA (Kiani et al., 2013).

Dois modelos são propostos para explicar como a metilação do DNA age na repressão da cromatina: diretamente, quando a Citosina metilada impede a ligação de fatores de transcrição aos promotores gênicos ou indiretamente, pelo

recrutamento de proteínas que se ligam às ilhas CpG (*Methyl-CpG-binding domain proteins*- MBPs) (Klose & Bird, 2006).

Tem sido atribuído à metilação um papel de defesa, que protege a célula contra transcrição de sequências estranhas, silenciando elementos de transposição e sequências repetitivas de DNA e, assim, estabilizando o genoma e garantindo a sua manutenção, de forma que genes vitais sejam acessíveis e ativos (Santos et al., 2005; Weber & Schubeler, 2007).

As histonas são susceptíveis a vários tipos de modificações pós-traducionais em sua cauda amino terminal (Peterson & Laniel, 2004). Muitos dos fatores *trans-acting* requeridos para a remodelagem da cromatina ligam-se diretamente às caudas das proteínas histonas por ação das enzimas metilases, acetilases e outras proteínas específicas (Lv et al 2012).

No processo de acetilação um grupo acetil ($\text{CH}_3\text{CO}-$) liga-se ao aminoácido lisina na cauda das histonas. A acetilação está associada com a remodelagem da cromatina e ativação de transcrição, enquanto a desacetilação provoca repressão de transcrição pela condensação cromatínica (Gilbert et al., 2005). A adição ou remoção de grupos acetil à cauda amino terminal das histonas é controlada por enzimas e desempenha papel importante na remodelagem da cromatina e expressão gênica (Choudhary et al., 2009; Nelson & Cox, 2011; Morine et al., 2012).

O mecanismo de RNAi (interferência pelo RNA) por meio de RNAs não codificantes (ncRNAs) pode, também, recrutar complexos de metilação, promovendo silenciamento gênico em nível transcricional.

Análise da remodelagem cromatínica, via mecanismos epigenéticos, é de interesse para muitos campos da Biologia e Medicina e uma variedade de métodos tem sido desenvolvidos para obtenção de dados que possibilitem complementar os estudos genéticos com análises epigenéticas.

5 Epigenética: Estudos em Abelhas e outros Insetos

Investigações têm demonstrado que alterações epigenéticas ocorrem em muitas linhagens de insetos, incluindo Hymenoptera (revisão em Glastad et al., 2011). Wang et al (2006) mostraram, a partir do genoma de *Apis mellifera*, que esse inseto tem sistema funcional de metilação em CpG, representado pelas enzimas DNA metiltransferases DNMT1 e DNMT3. O genoma revelou, ainda, que *A. mellifera* é mais similar aos vertebrados do que a outros insetos, com relação à metilação do DNA.

Kucharski et al. (2008) demonstraram que, em *A. mellifera*, o *knockdown* da expressão da metiltransferase DNMT3 é capaz de promover reprogramação epigenética e mimetizar o resultado da alimentação diferencial, com produção de rainhas a partir das larvas que foram submetidas a RNAi para o gene codificador da metiltransferase. Esse resultado demonstrou que a *down* regulação da DNA metiltransferase é capaz de reproduzir a mesma trajetória de desenvolvimento e induzir o mesmo fenótipo produzido pela dieta com geléia real (Miklos & Maleszka, 2011).

Análise da distribuição de metil Citosina em rainhas e operárias de *A. mellifera* mostrou diferenças moleculares não apenas durante o desenvolvimento larval, mas também no cérebro adulto (Lyko et al., 2010).

Na vespa *Nasonia vitripennis*, a enzima DNMT3 se expressa durante o desenvolvimento, em ambos os sexos, com níveis de transcritos significantemente mais elevados nos ovários do que em testículos (Santoro, 2009). No pulgão-da-ervilha *Acyrthosiphon pisum* foram identificados duas isoformas da DNMT1 e DNMT3 e 12 genes metilados (Walsh et al., 2010).

Nem todos os insetos estudados, entretanto, mostraram sinais evidentes de metilação.

Em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* não foi detectado um sistema de metilação ativo, com um repertório definido de enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Nos Diptera, não foram detectadas as proteínas DNMT1 ou DNMT3. (Urieli-Shoval et al., 1982; Wang et al., 2006; Miklos & Maleszka, 2011).

O besouro *Tribolium castaneum* perdeu a DNMT3 e, aparentemente, é incapaz de metilar DNA (*Tribolium Genome Sequencing Consortium*, 2008) mas, Feliciello et al. (2013) encontraram nesse inseto, Citosina metilada em embrião e metilação fraca em outros estágios.

Pediculus humanus (piolho) revelou perda de DNMT3, sugerindo que esse inseto não dispõe de sistema de metilação de DNA completamente funcional (Kirkness et al., 2010).

Em revisão sobre o tema, Glastad et al. (2011) apresentam um perfil da distribuição do sistema de metilação do DNA no *taxa inseto*. Ao contrário do genoma de vertebrados que é globalmente metilado, nos insetos, a metilação é gene-específica e, mesmo nos grupos de insetos onde a metilação foi detectada, as MBDs (*Methyl-CpG-binding domain proteins*) ainda são pobremente estudadas.

6 Referências Bibliográficas

Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the initiation of vitellogenin syntheses of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. In J Insect Sci, 1. Available on line insectscience.org/2.1.

Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Costa, L.F.; Simões, Z..L.P; Maleszka, R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Dev. Biol., 7: 70.

Beetsma, J. (1979) The process of queen-worker differentiation in the honeybee. Bee World 60, (I), 24-39.

Bergman, Y. Cedar, H. (2013) DNA methylation dynamics in health and disease. Nature Structural & Molecular Biology 20, 274-281.

Bonetti, A.M. (1982) Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em *Melipona* (Hymmenoptera, Apidae, Meliponidae). Mestrado, FMRP/USP, 140p.

Bonetti, A.M. (1983) Action of Juvenile Hormone on gene expression in *Melipona* (Hymmenoptera, Apidae, Meliponinae). Revista Brasileira de Genética, 4, VI, 583p.

Bonetti, A.M. (1984) Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. Revista Brasileira de Biologia, 4(44), 509-518.

Bonetti, A.M. (1990) Genética da Determinação de Casta em *Melipona*. Ação do Hormônio Juvenil sobre a Estareses e Corpora Allata durante desenvolvimento Pós-Embrionário. Tese Doutorado, FMRP/USP.

Bonetti, A.M., Cruz-Landim, C. & Kerr W.E. (1994) Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. *J. Apicultura Res.*, 1 (33), 11-14.

Bonetti, A.M., Kerr W.E. & Matusita, S.H. (1995) Effects of Juvenile Hormone I, II, III in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia*, 1 (55), 113-120.

Bonetti, A.M., Siquieroli, A.C.S., Santana, F.A., Vieira, C.U., Bezerra, M., Pereira, G.B., Simões, Z.L.P. & Cruz-Landim, C. da (2006) Effect of juvenile hormone III on the ultrastructure of the corpora allata in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sc.: Functional Anatomy and Cell Biol*, 23, 393-400.

Buschini, M.L. & Campos, L.A.O. (1991) Influência da alimentação e hormônio juvenil na determinação das castas em "*Trigona spinipes*" (Hymenoptera, Apidae). In: Anais da 43^a reunião da SBPC, Rio de Janeiro, RJ.

Camargo, C.A. (1972) Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Biologia*, 32 (1), 133-138.

Camargo, C.A.; Almeida, M.G.; Parra, M.G.M. & Kerr, W.E. (1976). Genetics of sex Determination in bees. IX. Frequencis of queen and worker from larvae under controlled conditions (Hymenoptera: Apoidea) *J.Kansas Entomol. Soc.* 49 (1), 120-125.

Camargo C.A. de (1977) Effects of juvenile hormone on diploid drones of *Melipona Quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera , Apidae) IUSSI. VIII Inter. Cong., Wageningen, Netherlands.

Camargo, J.M.F & Pedro, S.R.M. (2013) *Meliponini* Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera,

Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jul/14/2014

Campos, L.A.O. (1978) Sex determination in bees. VI. Effect of a Juvenile Hormone analogue in males and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). J Kansas Entom Soc, 51 (2), 228-234.

Campos, L.A.O. (1979) Determinação do sexo nas abelhas XIII. Determinação das castas em *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae). Papel do Hormônio Juvenil. Ciência e Cultura, 31 (1), 65-70.

Chen, T. & Dent, S.Y.R. (2014) Chromatin modifiers and remodelers: regulators of cellular differentiation. Nature Review / Genetics 15, 93-106.

Chen, T.P.; Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z.J.; Li, E. (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by DNMT3a and DNMT3b. Mol. Cell. Biol. 23, 5594-5605.

Choudhary, C.; Kumar, C.; Gnad, F.; Nielsen, M.L.; Rehman, M.; Walther, T.C.; Olsen, J.V.; Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. Science. 325 (5942), 834-840.

Clouaire T., de Las Heras J.I., Merusi C., Stancheva I. (2010) Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. Nucleic Acids Res. 38:4620-4634.

Cruz-Landim, C. da (2009) Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas. São Paulo, UNESP ed., 408 p.

Cruz-Landim, C. da; Hofling, M.C.A. & Fonseca, V.L.I. (1980) Identification of queens of *Melipona quadrifasciata* anthiodiodes (Apidae) whith the worker phenotype by a study of the tergal glands. Rev. Bras. Genet. III, 3, 295-302.

Evans, J.D. & Wheeler, D.E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.* 2(1): research0001.1–research0001.6.

Faustino,C.D.; Silva-Matos, E.V., Mateus, S. & Zucchi, R. (2002) First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) *Ins. Soc.*, 49, 111-113.

Feliciello, I.; Parazajder, J.; Akrap, I.; Ugarkov, D. (2013) First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*. *Epigenetics*. 8(5),534-541.

Gelman,D.B.; Pszczołkowski, M.I.; Blackburn, M.B.; Ramaswamy, S.B. (2007). Ecdysteroids and juvenile hormone of whiteflies, important insect vectors of plant viruses. *J. INS. Physiol.* 53(3) 274-284.

Glastad, K.M.; Hunt, B.G.; Yi, S.V.; Goodisman, M.A.D. (2011) DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol. Biol.* 20(5),553-565.

Gilbert, L.I. (2005) Comprehensive Molecular Insect Science, 7, Volume Set, USA, Elsevier Pergamon. Available online Science Direct (www.info.sciencedirect.com).

Gilbert, L.I., Granger, N.A. & Roe, R.M. (2000) The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol*, 30, 617-644.

Goll, M.G. & Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481-514.

Grewal, S.L. & Moazed D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*. 301 (5634), 798-802.

Hackett, J.A. & Surani, M.A. (2013) Beyond DNA: Programming and Inheritance of Parental Methylomes. *Cell* 153,737-739.

Hammock, B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: Kerkut, G.A. GilLbert L.I. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 7, Pergamon, Oxford, 431-472.

Hartfelder, K. & Engels, W. (1988) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. In Pedersen, R.A.& Schatten, G.P. (eds.) *Curr Top Dev Biol*, 40, 45-77.

Hartfelder, K. (2000) Insect juvenile hormone: from *status quo* to high society. *Braz J Med Biol Res*, 33, 157-177.

Haydak, H.M. (1970) Honey bee Nutrition. *Annual Review of Entomology*, 15, 143-156.

Jablonka, E.; Lamb, M.J. (2002) The changing Concept of Epigenetics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 981, 82-96.

Jaycox, E.R., Skawronek, W. & Guynn, G. (1974) Behavioral changes in worker honey bee (*Apis mellifera* L.) induction by injection of a juvenile hormone mimic. *Annals of the Entomological Society of America*, 67(4), 529-534.

Jeltsch, A. (2006) On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics* 1 (2), 63-66.

Judice, C.; Hartfelder, K.; Pereira, G.A.G. (2004) Caste-specific gene expression profile in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* - Are there common patterns in highly eusocial bees? *Insectes Soc.* 51, 352–358.

Judice, C.; Carazolle, M.F.; Festa, F.; Sogayart, M.C.; Hartfelder, K.; Pereira, G.A.G. (2006) Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee *Melipona quadrifasciata*. *Insect Mol Biol*, 15(1), 33-44.

Kerr, W.E. (1946) Formação das castas no gênero *Melipona* (Illiger 1806) Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ,USP, 3, 299-312.

Kerr, W.E. (1948) Estudos sobre o gênero *Melipona*. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 5, 181-276.

Kerr, W.E. (1950) Genetic Determination of Castes in the Genus *Melipona*. *Genetics*, 35, 143-152.

Kerr, W.E. (1974) Sex determination in bees. III. Caste determination and genetics control in *Melipona*. *Ins. Soc.*, 21(4), 357-368.

Kerr, W.E. (1975) Evolution of the population structure in bees. *Genetics* 79, 73-84.

Kerr W.E. (1976) Genetica da determinação do sexo em abelhas. X. Programação da atividade dos genes determinadores do sexo e casta. *Ann. 3 Cong. Bras. Apic.*, 179-187.

Kerr W.E.; Stort, A.C. & Montenegro, M.J. (1966) Importancia de alguns fatores ambientais na determinação das castas do genero *Melipona*. *Ann. Acad. Bras. Cien.* 38 (1), 149-168.

Kerr, W.E. & Nielsen, R.A. (1966) Evidences that genetically determined melipona queens can become workers. *Genetics*, 54 (3), 859-866.

Kerr, W.E.; Carvalho G.A.; & Nascimento, V.A. (1996) Abelha Urucu: Biologia, Manejo e Conservação. Belo Horizonte – MG, Ed. Acangaú, 143 p.

Kiani, J.; Grandjean, V.; Liebers, R.; Tuorto, F.; Ghanbarian, H; Lyko, F.; Cuzin, F. & Rassoulzadegan, M (2013) RNA-Mediated Epigenetic Heredity Requires the Cytosine Methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genetics* 9(5) e1003498.

Kirkness, E.F.; Haas, B.J.; Sun, W.; et al. (2010) Genome sequence of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle . *Science* 107(27),12168-12173.

Klose, R.J. & Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31,89-97.

Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S. & Maleszka, R. (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827-1830.

Lattorff, H.M.G. & Moritz, R.F.A. (2012) Genetic underpinnings of division of labor in the honeybee (*Apis mellifera*). *Trends in Genetics* 29 (11), 641-648.

Liang, Y.; Chang, J.; Lynch, S.J.; Lukac, D.M.; Ganem, D. (2002). The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev.* 16,1977-1989.

Lv, W-W., Wei,H-M.; Wang, D-L.; Ni, J-Q; Sung, F-L. (2012) Depletion of histone deacetylase 3 antagonizes PI3K-mediated overgrowth of Drosophila organs through the acetylation of histone H4 at lysine 16. *J. Cell Sci.*, 125, 5369-5378.

Lyko, F., & Maleszka, R. (2011). Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends in Genetics*, 27 (4), 127-131.

Lyko F.; Foret S.; Kucharski R.; Wolf S.; Falckenhayn, C.; Maleszka, R. (2010) The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biol* 8 (11), 1-12, e1000506, doi1361.

Maleszka, R. (2008) Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics*, 3 (4), 188–192.

Marco Antonio, D.s.; Guidigli-Lazzarini, K.R.; Nascimento, A.M. dos; Simões Z.L. (2008). RNAi mediated silencing of vitellogenin gene functions turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften*.

Michener, C.D. (1974) The social behavior of the bees: a comparative study. London, Cambridge, Mass., Harvard University Press.

Michener, C.D. (2000) The bee of the world. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press, 913p.

Miklos, G.L.G.; Maleszka, R. (2011) Epigenomic communication systems in humans and honey bees: From molecules to behavior. *Horm. Behav.* 59 (3), 399-406.

Morine, Y.; Shimada, M.; Iwahashi, S. Utsunomiya, T.; Imura, S.; Ikemoto, T.; Miyake, H. (2012) Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery* 151 (3), 412-419.

Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2011) Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5º Ed. Porto Alegre – RS, ed.ArtMed. 1274p.

Nijhout, H.F. & Wheeler, D.E. (1982) Juvenile hormone and physiological basis of insect polymorphism. *Quaterly Review Biol.*, 57 (2), 109-133.

Peterson, C.L. & Laniel, M.A. (2004). Histone and histone modification. *Curr. Biol.* 14 (14), 546-551.

Robinson, G.E. & Vargo, E.L. (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Insect Biochem Physiol*, 35, 559-583.

Roller, H., Dahm K.H., Sweely, C.C. & Trost, B.M. (1967) The structure of juvenile hormone (giant silkworm moth *Hyalophora cecropia*). *Angew. Chem. Int. Edn*, 6, 179-180.

Santana, F.A.; Nunes, F.M.F.; Vieira, C.U.; Machado,M.A.M.S. Kerr, W.E.; Silva Jr., W.A., Bonetti, A.M. (2006) Differentially displayed expressed sequence tags in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae) devlopment. *Anais Academia de Ciencias*. 78(1)1-7.

Santoro, T. (2009) Molecular genetic analysis of key DNA methylation toolkit genes in the jewel wasp, *Nasonia vitripennis*. *Dissertação de mestrado*, Western Washington University, USA 135p.

Santos, K.F.;Mazzola, T.N.; Carvalho, H.F. (2005) The prima Donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz. J. Med. and Biol. Res.* 38, 1531-1541.

Sasaki, H. & Matsui, Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics* 9, 129-140.

Siquieroli, A.C.S.; Vieira, C.U.; Carvalho-Zilse, G.A.; Goulart, L.R.; Kerr, W.E.; Bonetti, A.M. (2009) Analysis of the Intercastes Transcriptional Profile of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by mRNA Differential Display. *Biological Research* 42, 107-110.

Snodgrass, R.E. (1956) Anatomy of the honeybee. UK Ithaca & London, Comstock Publishing Associates, 334p

Taylor, P.A. 3rd; Bhatt, T.R.; Horodyshi, F.M. (1996). Molecular characterization and expression analyses of *Manduca sexta* allatotropin. *Europ. J. Biochem.* 23 (3), 588-596

Terada, Y. (1974) Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Friesomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). Mestrado, FMRP/USP, 96 p.

Tribolium Genome Sequencing Consortium (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949-955.

Urieli-Shoval, S.; Gruenbaum, Y.; Sedat, J.; Razin, A. (1982) The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *Febs Lett.* 146, 148-152.

Velthuis, H.H.W., Roeling, A. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2001) Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. *Proceedings of the Experimental and Applied Entomology*, 12, 45-49.

Vieira, C.U.; Bonetti, A.M.; Simões, Z.L.P.; Maranhão, A.Q.; Costa, C.S. ; Costa, M.C.R.; Siquieroli, A.C.S.; Nunes, F.M.F. (2008) Farnesoic Acid O-Methyl Transferase (FAMeT) isoforms: conserved traits and gene expression patterns related to caste differentiation in the stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 67, 97-106.

Walsh, T.K.; Brisson, J.A.; Robertson, H.M.; Gordon, K.; Jaubert-Possai, S.; Tagu, D.; Edwards, O.R. (2010) A functional DNA methylation system in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Ins. Mol. Biol.* 19 (2), 215-228.

Wang, Y.; Jorda, M.; Jones, P.L.; Maleszka, R.; Ling, X.; Robertson H.M.; Mizzen, C.A.; Peinado, M.A.; Robinson, G.E (2006) Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314, 645-647.

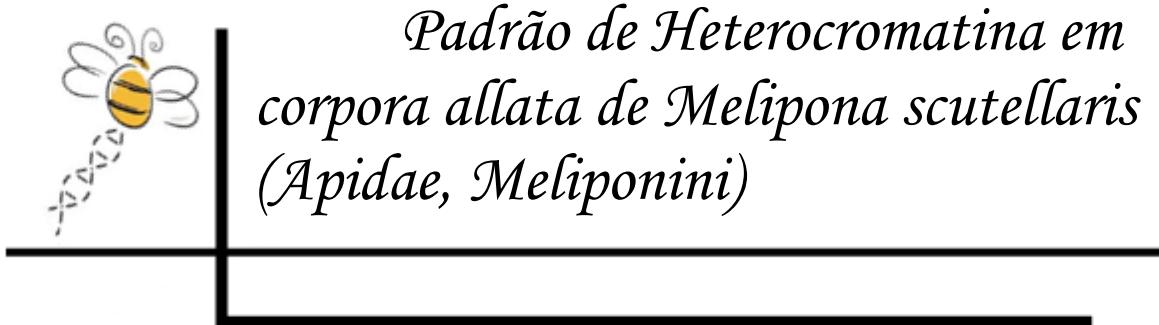
Weber, M. & Schubeler, D. (2007) Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Current Opinion in Cell Biology* 19, 273-280.

Wigglesworth, V. B., (1970) Insect hormones. S. Francisco, USA, W.R. Reeman.

Wigglesworth, V. B., (1936) The distribution of auriferous tracheal for the ovaries of insects. *Tissue and Cell*, 2, 155.

Wilson E.O. (1971) The insect societies. Cambridge, MA: Belknap Press. Museum of Comparative Zoology. Harvard University, Cambridge. MA, 548 p.

Capítulo 2



*Padrão de Heterocromatina em
corpora allata de Melipona scutellaris
(Apidae, Meliponini)*

1. Resumo

Na maioria dos Hymenoptera, a diferenciação de castas ocorre via alimentação diferencial da larva. As abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* representam uma exceção a essa regra. Operárias emergem de células de cria do mesmo tamanho, com a mesma quantidade e qualidade de alimento e os fenótipos divergentes das fêmeas dependem de um mecanismo que envolve componente genético associado a componente ambiental. Os diferentes fenótipos das fêmeas pode ser resultado de modulação casta-específica por Hormônio Juvenil (HJ) durante o desenvolvimento larval. Além disso, a heterocromatina desempenha papel importante na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação celular, por meio de controle epigenético de processos fisiológicos, morfológicos e comportamentais. Com objetivo de verificar possível papel epigenético na diferenciação de castas em *M. scutellaris*, núcleos de células de *corpora allata* de rainha e operárias e, também, de rainha induzida por tratamento com HJ foram comparados por meio de imagens obtidas por microscopia confocal e analisados por reconstrução computacional. Nossos resultados apresentam semelhanças e diferenças de padrão da heterocromatina, formato, volume total e de heterocromatina em núcleos de células de *corpora allata* de operária e rainha de *M. scutellaris*.

Palavras-chave: abelha sem ferrão, padrão de heterocromatina, expressão gênica, *Melipona scutellaris*, análise de imagens

2. Abstract

In a majority of Hymenoptera, the caste differentiation occurs via larva differential feeding. *Melipona* stingless bees represent an exception to this rule. Workers and queens emerge from brood cells of the same size, with the same quantity and quality of food and the different phenotypes of female bees depend on a mechanism involving a genetic component associated with the environmental component (food). The different female phenotypes may be a result of the caste-specific modulation of Juvenile Hormone (JH) titers during larval development. In addition, heterochromatin plays an important role in regulating gene expression during cell development and differentiation, by means of epigenetic control of physiological, morphological and behavioral processes. With the objective of evaluating the possible epigenetic role in caste differentiation in *M. scutellaris*, cell nuclei of the corpora allata glands of queens, workers, and JH induced queens were compared using images captured by confocal microscopy and analyzed by computational reconstruction. Presented are the results of similarities and differences in the pattern, format, and total volume of heterochromatin in the cell nuclei of corpora allata of worker and queen bees of *M. scutellaris*.

Keywords: stingless bee, heterocromatin pattern, gene expression, *Melipona scutellaris*, images analysis

3. Introdução

A análise do conteúdo e localização da heterocromatina divide as abelhas do gênero *Melipona* em dois grupos funcionais, um com baixo conteúdo de heterocromatina e outro com alto conteúdo (Rocha & Pompolo, 1998; Rocha et al., 2002) o que foi corroborado por análise de metilação em ilhas CpG (Mampumbu & Mello, 2006). *Melipona scutellaris*, objeto da presente investigação, pertence ao grupo de alto conteúdo de heterocromatina (Rocha et al 2002).

A divergência de fenótipos de fêmeas de abelhas pode ser resultado de modulação casta-específica dos títulos de Hormônio Juvenil (HJ) e ecdisteróides durante o desenvolvimento larval (Hartfelder & Engels 1988; Hepperle & Hartfelder, 2001; Bonetti et al., 1995). Diferenças morfológicas distinguem as castas em relação à capacidade de ovipositar (Bonetti, 1982, 1984; Engels et al., 1990; Barchuk et al., 2002) dentre outras características morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Bonetti, 1984, 1990; Bonetti et al., 1994, 2006). A regulação da síntese de HJ tem sido considerada de extrema importância e evidências tem se acumulado a respeito do controle gênico exercido pelo HJ, especialmente em *Melipona*, onde já foram detectados transcritos gênicos diferencialmente expressos nas castas (Bonetti et al., 1994; Judice et al., 2004, 2006; Santana et al., 2006; Siqueroli et al., 2009; Vieira et al., 2008).

A heterocromatina desempenha papel importante na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação celular, por meio de controle epigenético sobre processos fisiológicos.

Epigenética diz respeito a processos que alteram a estrutura da cromatina e a expressão gênica sem que haja mudança na sequência de nucleotídeo do ácido nucléico. A montagem e compactação da cromatina são reguladas por múltiplos mecanismos, que incluem modificações do DNA (metilação, hidroximemetilação) e modificações pós-traducionais das histonas (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação) além de remodelagem promovida por RNAs não-codificantes (Revisão em Chen & Dent, 2014).

É possível que as abelhas apresentem um sistema de reprogramação epigenética funcional devido à presença de genes e proteínas relacionadas aos

processos epigenéticos conforme encontrado no genoma de vários insetos, inclusive na abelha *Apis mellifera* (Wang et al., 2006; Kucharski et al., 2008). Cerca de 600 genes são metilados de forma diferente no cérebro de rainhas e operárias de *A. mellifera*, o que pode ser indício de que a plasticidade dos fenótipos em abelhas esteja ligada a metilação do DNA (Frommer et al., 1992).

Nos animais, a metilação tem sido relacionada à progressão e desenvolvimento (Kucharski et al., 2008) formação da memória (Lockett et al., 2010) carcinogênese (Jones & Baylin, 2002) e longevidade (Greer et al., 2011). Nos vertebrados, outro papel da metilação é o de reprimir a atividade dos elementos de transposição (O'Neill et al., 1998; Grewal & Songtao, 2007).

O estado de condensação da cromatina pode sofrer modificações ao longo da maturação celular e essa remodelagem estabelece um código epigenético que está diretamente relacionado à expressão de genes das células eucarióticas durante o desenvolvimento e diferenciação celular (Fischle et al., 2003; Portela & Esteller, 2010; Gifford et al., 2013).

A metilação do DNA tem sido investigada por meio de técnicas de genética molecular, bioquímica, métodos de análise computacional, análise de imagens, microscopia, densitometria, análise de conteúdo normalizado do dinucleotídeo CpG, polimorfismo, imunoprecipitação de DNA metilado, sequenciamento de DNA tratado com bissulfito e outros (Glastad et al., 2011).

Padrões de heterocromatina e possíveis modificações epigenéticas do material genético, reguladas pela condensação do DNA, têm sido alvo de diferentes estudos. Nos últimos anos avanços substanciais tem ocorrido no entendimento do papel das modificações de histonas e da remodelagem da cromatina na diferenciação celular. No entanto, dados sobre a heterocromatina em diferentes castas de abelhas ainda são raros, especialmente, em *Melipona scutellaris*, material biológico desse trabalho.

Genética e Epigenética são fenômenos relacionados, responsáveis pela herança de caracteres e produção de fenótipo em cada célula.

Considerando que a variação na quantidade e qualidade do alimento larval não é suficiente para diferenciação em rainha ou operária em *Melipona* (Kerr, 1975; 1976; Kerr et al., 1966; Camargo et al., 1976; Bonetti, 1983) e que análises moleculares indicam a presença de transcritos gênicos diferencialmente

expressos nas castas (Bonetti et al., 1994; Judice et al., 2004; Santana et al., 2006; Siqueroli et al., 2009; Vieira et al., 2008) a pergunta que buscamos responder é se mecanismos epigenéticos associados à remodelagem da cromatina estariam, de alguma forma, envolvidos na diferenciação de castas nas abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*.

Dados preliminares, a partir do transcriptoma de larva total e *corpora allata* de *Melipona scutellaris* (Ueira-Vieira et al., informação pessoal) e do transcriptoma de corpo gorduroso dessa abelha (Sousa et al., 2013) indicam a presença de genes codificadores de enzimas da maquinaria de metilação.

Se cromatina condensada reflete menor taxa de transcrição e se um mecanismo que envolve fatores genéticos e ambientais (alimento) está envolvido no dimorfismo entre as fêmeas de *Melipona*, uma hipótese que se levanta é a de que a organização da heterocromatina e os mecanismos epigenéticos podem ser agentes da diferenciação de castas nesse gênero de abelhas, por meio da expressão diferencial de genes, em função de um mecanismo genético e epigenético casta-específico associado ao alimento.

Essa hipótese nos levou investigar o padrão da heterocromatina em rainhas e operárias, como fenótipo morfológico para explicar o dimorfismo, visto que são poucos os dados sobre a organização da cromatina em abelhas, especialmente em *Melipona scutellaris*, material biológico deste trabalho.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Comparar a organização da heterocromatina em rainhas e operárias de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* e verificar se ocorre um padrão de heterocromatina casta-específico.

4.2. Objetivo Específico

Comparar, por meio de análises morfológicas e reconstrução computacional a partir de imagens geradas por microscopia confocal, o padrão da heterocromatina em núcleos de células das glândulas *corpora allata* de rainhas (natural e induzida por tratamento com Hormônio Juvenil) e de operárias (recém emergida, nutridora e forrageira) de *Melipona scutellaris*.

5. Material e Métodos

5.1. Material Biológico

Os experimentos conduzidos nesse estudo utilizaram abelhas sem ferrão, *Melipona scutellaris* (Figura 4) mantidas no Meliponário UFU (S 180 55' / W 450 17') do Instituto de Genética e Bioquímica / Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética / INGEB e no Laboratório de Análise de Imagem / ICBIM da Universidade Federal de Uberlândia.



Figura 4. Estrutura interna da colônia de *Melipona scutellaris* mostrando favos horizontalmente dispostos com operárias (**setas brancas**), rainha (**seta preta**), célula de cria em construção (**seta azul**) e célula de cria operculada (**seta verde**). Em destaque célula de cria aprovisionada e com ovo depositado verticalmente.

5.2. Indução de Rainhas por tratamento com Hormônio Juvenil (HJ)

Larvas de *M. scutellaris* do 3º instar (Figura 5) nos estágios L3-3 (Larva 3) ou LPD (Larva Pre-Defecante) foram retiradas do favo de cria com auxilio de pinça de ponta romba, colocadas em placa de Petri forradas com papel de filtro e tratadas topicalmente com dose única de 5 µg de Hormônio Juvenil III (C16 Juvenile Hormone FLUKA) dissolvido em 1 µL de Acetona P.A. (MERCK) de acordo com Bonetti et al. (1995) .

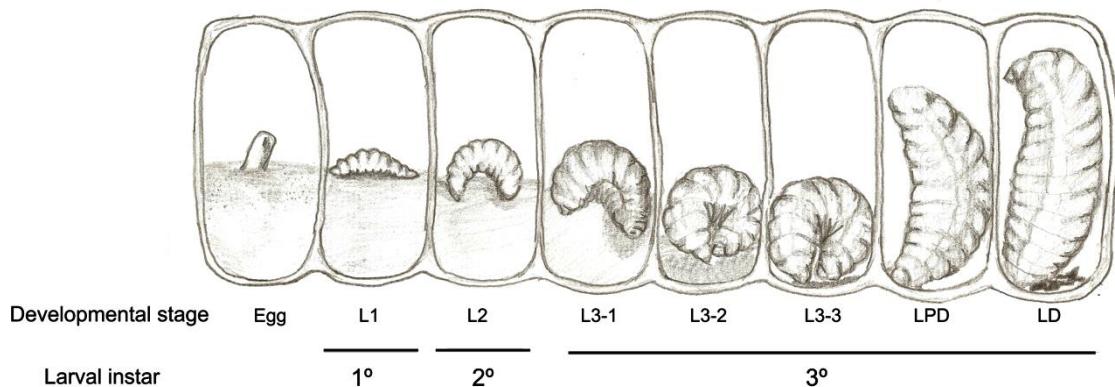


Figura 5: Esquema representando o desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de *Melipona scutellaris* (Fonte: Amaral et al., 2010). Larvas nos estágios de L3-3 e LPD foram utilizadas para o tratamento com Hormônio Juvenil

O grupo controle foi constituído por larvas tratadas com 1µL de acetona e larvas sem tratamento, manipuladas do mesmo modo que o grupo experimental. Larvas para tratamento com HJ e controle foram coletadas em colônias fortes (produtoras de operárias, rainhas e machos). As placas com larvas foram mantidas em estufa a 29-30°C com umidade relativa de 70-75% obtida por meio de solução saturada de KCl (ASTM, 2002). A condição de operária, rainha natural e induzida foi avaliada por meio de características morfológicas já definidas em trabalho anteriores (Campos, 1978, 1979a; Bonetti, 1982).

5.3. Obtenção dos corpora allata

Os *corpora allata* (CA) de 5 indivíduos de cada estágio, operaria recém emergida, nutridora e forrageira; rainhas naturais e induzida por tratamento com Hormônio Juvenil (obtida em placa com 100% das larvas induzidas vivas e transformadas em rainhas) foram obtidos por dissecção sob esteremicroscópio (Nikon) após os indivíduos serem anestesiados a frio (4°C).

5.4. Microscopia Confocal

O padrão de heterocromatina em núcleos de células de *corpora allata* de operária (recém emergida, nutridora e forrageira) e de rainha (natural e induzida por HJ, recém emergidas) foi comparado por meio de análises de imagens geradas por microscopia confocal.

As glândulas *corpora allata* foram permeabilizadas *in vivo* com TRITON X-100 (0,1%) e Citrato de sódio (0,1%) e mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida, lavadas por três vezes com PBS – phosphate buffered saline (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5) com duração de 5 minutos cada lavagem e incubadas, em câmara escura, durante 45 minutos com corante YO-PRO-1-iodice (491/509 INVITROGEN) 1mM dissolvido em DMSO - Dimetilsulfóxido (INVITROGEN). Os *corpora allata* dissecados foram colocados em lâmina com glicerina e vedada com esmalte, para visualização ao Microscópio Confocal (FluoView® 1000).

5.5. Montagem de imagem

A montagem das imagens foi processada de acordo com instruções em Travençolo (2007) e que descrevemos:

Pré-processamento: cada imagem, com os dados da anatomia dos núcleos das células dos *corpora allata*, foi segmentada por limiarização. Não foi necessário o uso de alinhamento das secções (imagens) subsequentes pois imagens coletadas por microscopia confocal já são naturalmente alinhadas.

Reamostragem dos dados: Nas imagens obtidas, o tamanho representado por um pixel na direção do eixo **x** é igual ao tamanho representado por um pixel na direção do eixo **y**. Nesse trabalho consideramos volumes 3D, utilizando, também, o eixo **z**. Entretanto, o tamanho no eixo **z** (i.e., a distância entre duas imagens consecutivas) é normalmente maior que o tamanho dos pixels nos eixos **x** e **y**. Dessa forma, é necessário realizar, antes de qualquer cálculo ou reconstrução 3D, um processo de reamostragem dos dados, para que a distância correspondente em **z** seja a mesma que em **x** e **y**.

Reconstrução 3D: as imagens resultantes do processo de reamostragem foram suavizadas por um filtro Gaussiano e, em seguida, foi feita a reconstrução por isosuperfícies.

Os agrupamentos refletem o fluxo usual da informação após a captura dos dados biológicos.

As imagens foram subdivididas em suas partes ou objetos constituintes, localizando as regiões que correspondem à heterocromatina que queremos identificar. A imagem resultante da segmentação possui apenas três regiões sendo que, nesse caso, os locais representados pela cor marrom indicam as regiões de heterocromatina e os locais em cor verde correspondem à morfologia da glândula. Os locais restantes correspondem ao fundo da imagem e não são considerados em nenhuma análise. A determinação de cada região é feita por meio da técnica de limiarização, sendo que o mesmo limiar foi usado em todas as imagens analisadas.

Após a segmentação da imagem, para identificar os diferentes objetos nela presentes, foi determinado, automaticamente, quantas dessas regiões existem na imagem. Para isso foi realizada a rotulação de componentes conexos, que permite usar técnicas para extrair características individuais dos núcleos das células dos *corpora allata*, como o volume. No caso, o cálculo do volume é feito contando quantos pixels pertencem a um determinado núcleo e multiplicando

esse valor pelo tamanho do pixel em μm^3 . Esse cálculo foi usado para determinar o volume dos núcleos e das regiões de heterocromatina.

Com os dados numéricos obtidos, foram quantificadas e comparadas as regiões heterocromáticas nas células dos *corpora allata* de operária recém emergida, nutridora, forrageira e de rainha natural e rainha induzida por HJ recém emergidas.

Obtivemos volumes 3D e utilizamos a reconstrução por isosuperfícies (por meio da biblioteca VTK), onde todo o volume é percorrido à procura de pontos de valor pré-definido. Aos pontos são associadas primitivas geométricas que, ao final do processo, delimitam uma superfície.

5.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa estatístico *GraphPad Prism (Version 5.0)* utilizando análise de variância (ANOVA). Para verificação de possíveis diferenças entre as médias de cada fator estudado foi utilizado o teste de Mann Whitney e Kruskal-Wallis.

6. Resultados

O padrão de organização da heterocromatina e o volume total de núcleo e de heterocromatina de células de glândulas *corpora allata* de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* foram investigados por meio de reconstrução computacional de imagens capturadas por microscopia confocal.

Os *corpora allata* (Figura 6) são glândulas endócrinas que se originam a partir do ectoderma, na porção ventral da cabeça e migram para sua posição definitiva, dorsolateralmente ao esôfago, no embrião do inseto (Snodgrass, 1956; Wigglesworth, 1970; Gilbert, 2005, Cuz-Landim, 2009) e são responsáveis pela produção de HJ que é secretado diretamente na hemolinfa (Lattorff & Moritz, 2013).

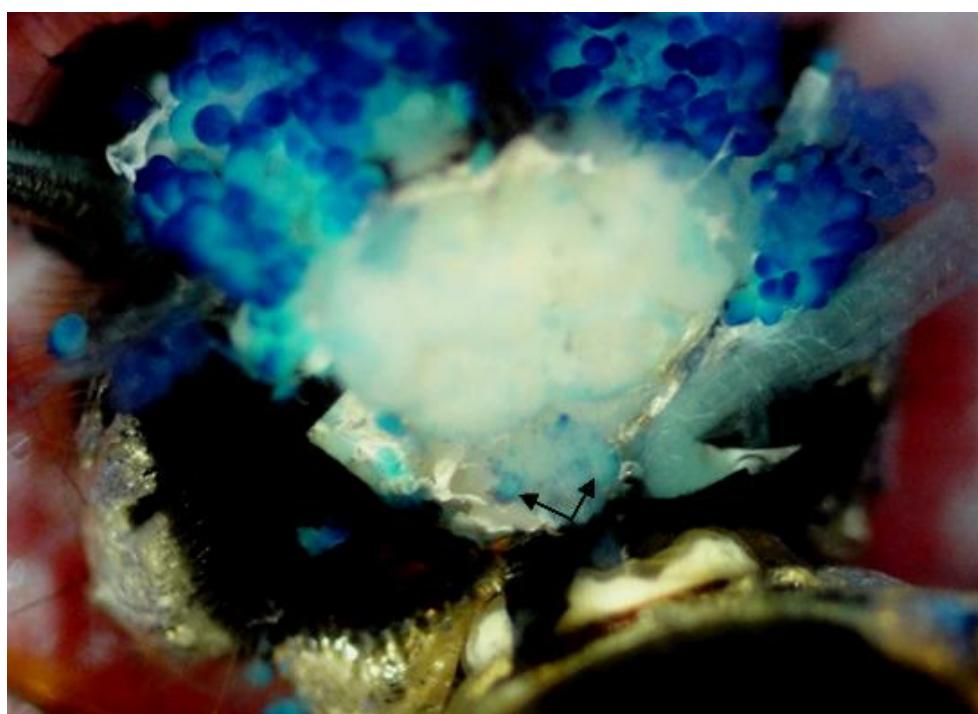


Figura 6. Glândulas *corpora allata* (setas) de operária de *Melipona scutellaris*. Dissecção sob estereomicroscópio. Coloração com azul de bromotinol (BTB) para fins didáticos de visualização da glândula.

As imagens obtidas por microscopia confocal das glândulas *corpora allata* de operária adulta (recém emergida, nutridora e forrageira) gerou a sobreposição de

imagens para visualização em 3D das glândulas (Figura7 A-C) mostrando os núcleos das células de uma glândula.

Foi possível o isolamento e análise de núcleos de células das glândulas *corpora allata* das operárias e realizada reconstrução total para gerar valores de volume do núcleo (Figura 7 D-F).

Os núcleos de célula de *corpora allata* de rainha apresentaram formato mais ovalado do que os de operária.

Utilizando a intensidade dos pixels emitidos na microscopia confocal foram geradas imagens que mostram a dispersão da heterocromatina nos núcleos de células de *corpora allata* de operária adulta de *M. scutellaris* (Figura 7 G-I).

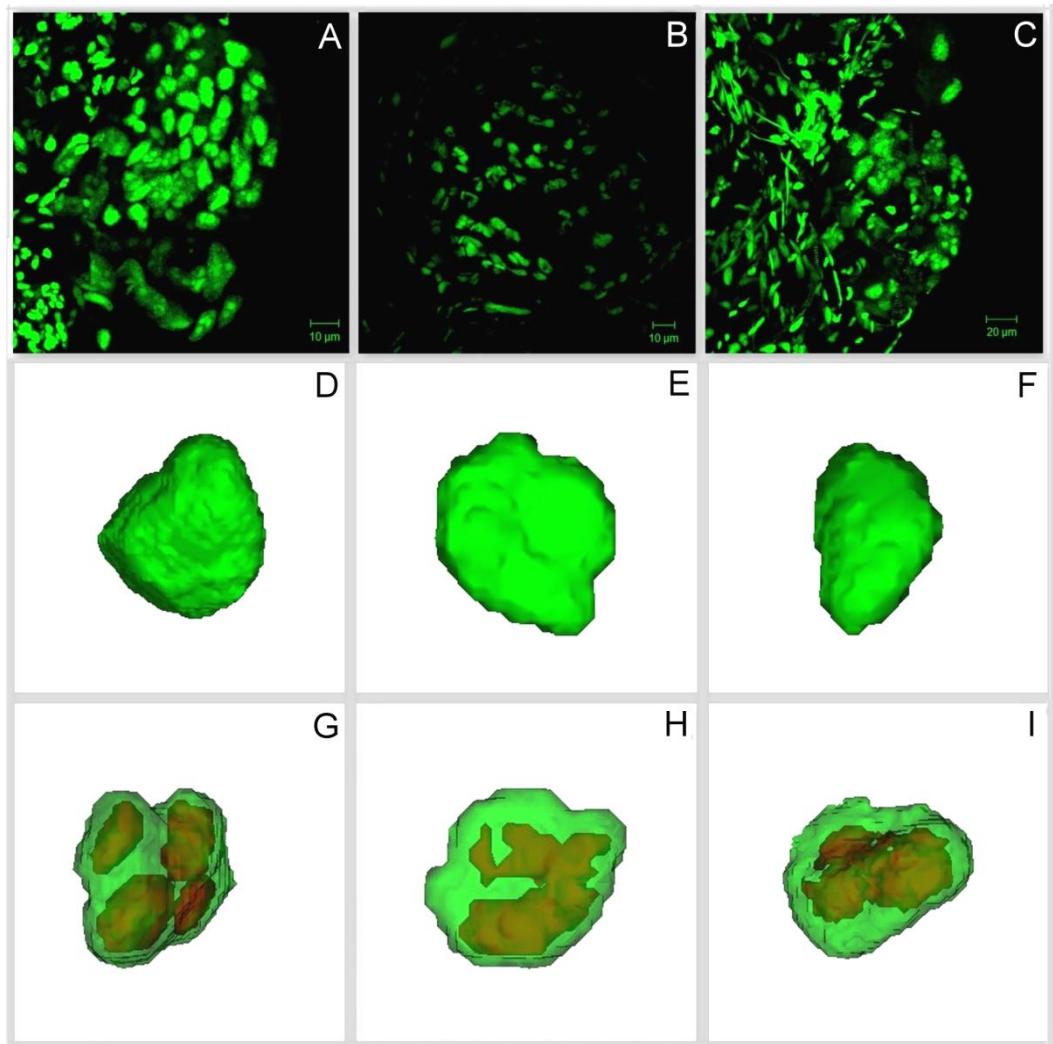


Figura 7: Imagens de microscopia confocal de glândulas *corpora allata* de *Melipona scutellaris* em operária recém emergida (**A**) operária nutridora (**B**) e operaria forrageira (**C**). Núcleos individuais, gerados por reconstrução computacional de células de *corpora allata* de operaria recém emergida (**D**) nutridora (**E**) e forrageira (**F**). Dispersão da heterocromatina em operária recém emergida (**G**) nutridora (**H**) e forrageira (**I**). Em verde, o núcleo total e em marrom, a heterocromatina. Coloração com YO-PRO.

Resultados da análise individual do volume de heterocromatina e do núcleo total em operárias recém emergida, nutridora e forrageira de *M. scutellaris* são mostrados na Figura 8.

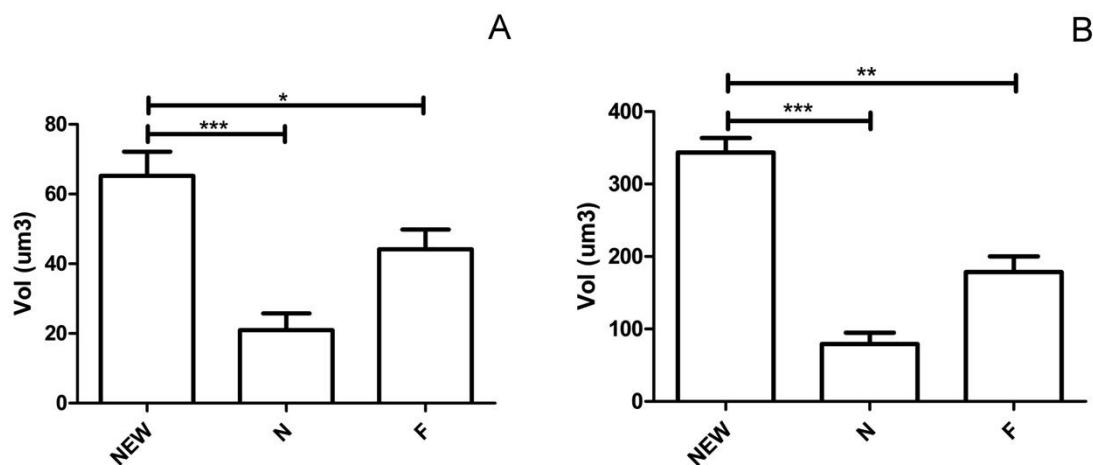


Figura 8: Representação (média e desvio padrão) do volume da heterocromatina (**A**) e volume total de núcleo (**B**) em operária recém emergida (**NEW**) nutridora (**N**) e forrageira (**F**) de *Melipona scutellaris*. Asterisco (*) indica diferença estatística significativa (Mann Whitney test; $p<0,05$).

Operaria recém emergida apresentou maior volume de heterocromatina (Figura 8A) e de volume total do núcleo (Figura 8B) do que nutridora e forrageira (teste Mann Whitney; $p<0,05$). Entre nutridoras e forrageiras não se detectou diferença de volume de heterocromatina ou de núcleo.

A sobreposição de imagens proporcionou a visualização 3D das glândulas *corpora allata* (Figura 9).

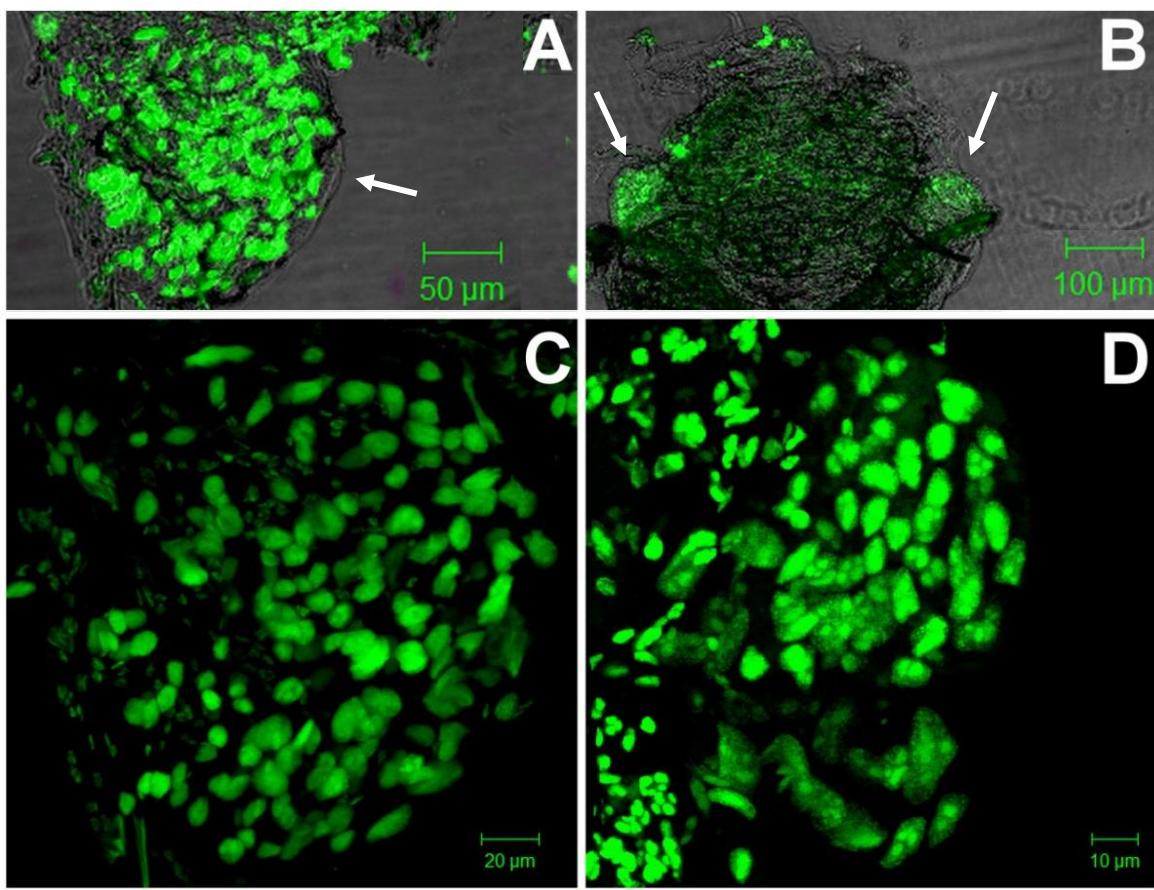


Figura 9: Imagens de glândulas *corpora allata* de *Melipona scutellaris* geradas por microscopia confocal e coloração com YO-PRO. Glândula *corpora allata* (setas) de rainha recém emergida (**A**) de operária recém emergida (**B**). Imagem 3D de núcleos de glândula de rainha recém emergida (**C**) e de operária recém emergida (**D**).

O volume de núcleo e a dispersão da heterocromatina nos núcleos de células de *corpora allata* de operária e rainha recém emergidas são mostrados na Figura 10 (A-D).

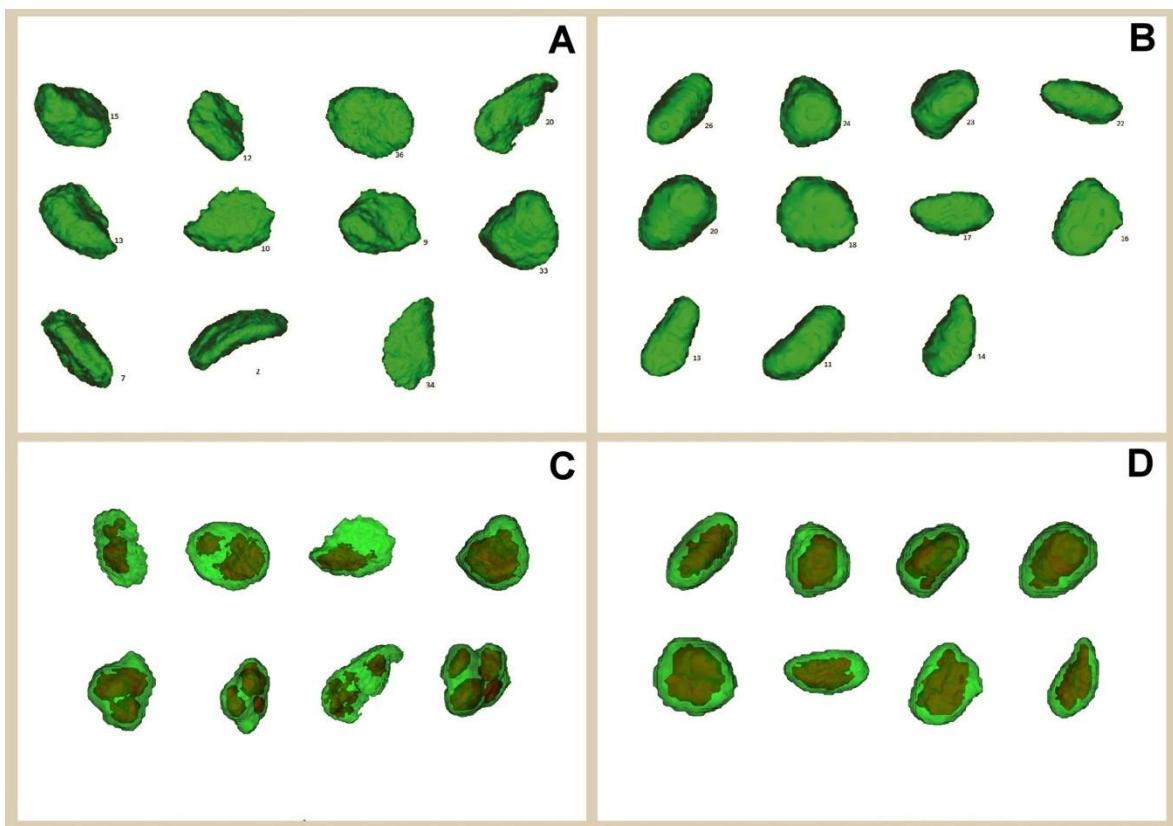


Figura 10: Imagens de núcleos isolados de células de *corpora allata* de *Melipona scutellaris*. Volume total de núcleo em operária recém emergida (**A**) e rainha recém emergida (**B**). Dispersão da heterocromatina em núcleo de célula de *corpora allata* de operária recém emergida (**C**) e rainha recém emergida (**D**). Imagens obtidas por reconstrução 3D de cada núcleo para gerar valores de volume e análise de pixels emitidos pela coloração por YO-PRO para visualização da heterocromatina.

Houve diferença significativa (teste de Mann Whitney; $p<0,05$) entre o volume total de núcleos (Figura 11B) de rainha e operária recém emergida. Operárias mostraram núcleo das células com maior volume do que rainhas recém emergidas..

Não foi detectada diferença entre volume de heterocromatina entre rainha e operária, em indivíduos de mesma idade (Figura 11A).

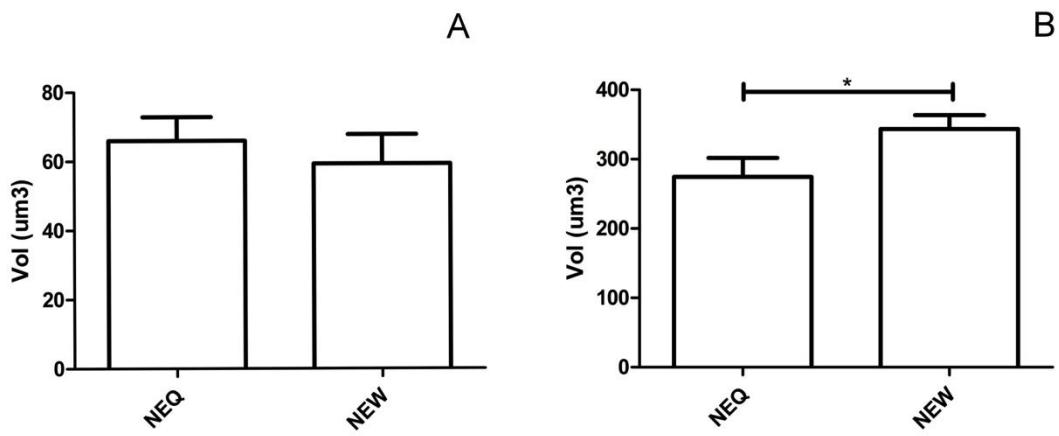


Figura 11. Representação gráfica (média e desvio padrão) de volume de heterocromatina (A) e volume total de núcleo (B) de célula de *corpora allata* de *Melipona scutellaris*. NEQ = Rainha Recém Emergida e NEW = Operária Recém Emergida. Asterisco (*) indica diferença estatística significativa (teste de Mann Whitney $p<0,05$).

Glândulas *corpora allata* de rainhas natural e induzida por tratamento com HJ e operária foram dissecadas para marcação com a sonda de fluorescência YOPRO, visualização em microscopia confocal e reconstrução computacional de núcleos para comparação (Figura 12).

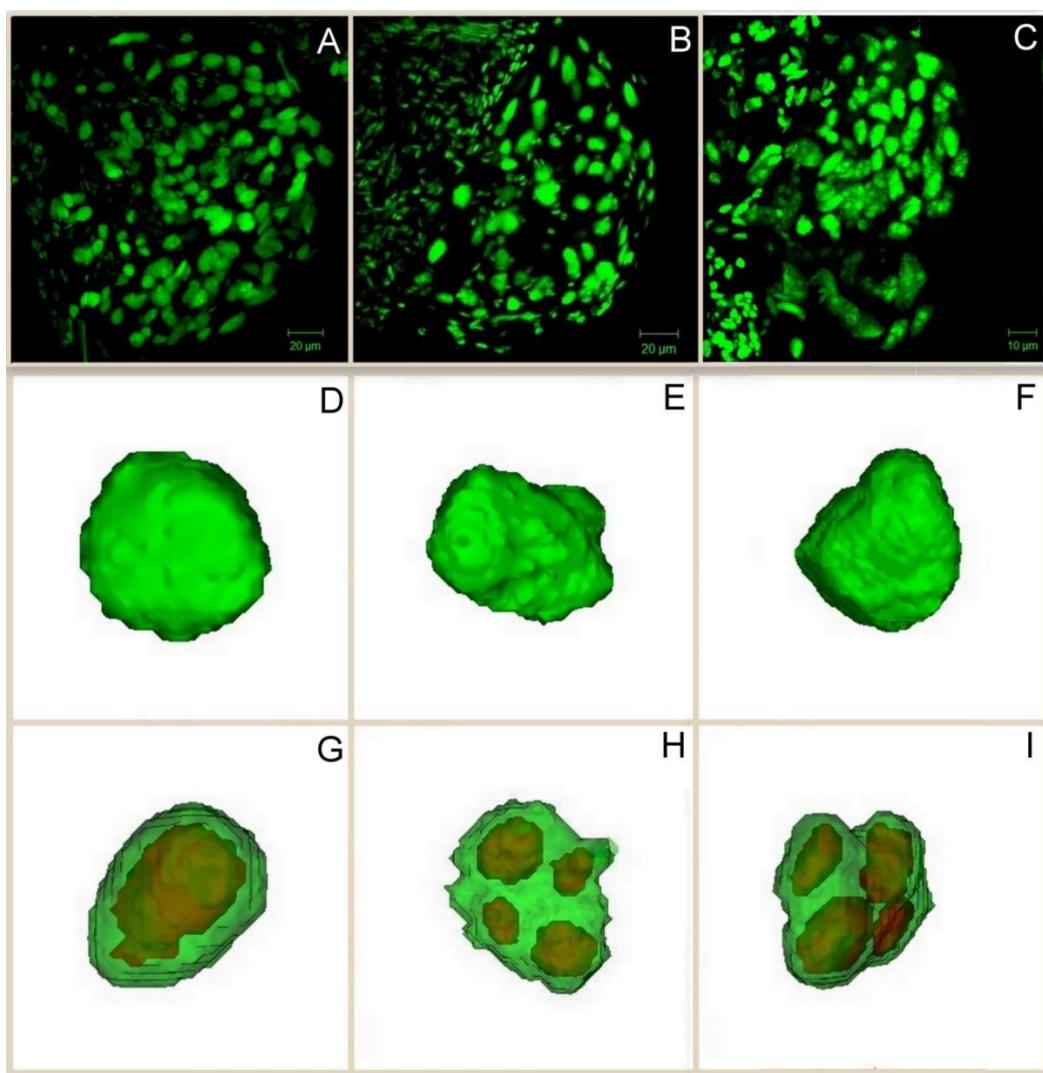


Figura 12: Visão geral das glândulas *corpora allata* de *Melipona scutellaris*, a partir de imagem obtida por coloração com YO-PRO em Rainha natural (**A**) Rainha induzida por tratamento com HJ (**B**) operária recém emergida (**C**). Reconstrução computacional para volume total de núcleo de rainha natural (**D**) rainha induzida por tratamento com Hormônio Juvenil (**E**) e operária recém emergida (**F**). Dispersão da heterocromatina em núcleos de rainha natural (**G**) rainha induzida por Hormônio Juvenil (**H**) e operária recém emergidas (**I**).

A intensidade dos pixels emitidos na microscopia confocal após marcação com o corante YO-PRO gerou imagens que mostraram o volume total do núcleo (Figura 12; D-F) e a dispersão da heterocromatina nos núcleos de rainha natural, rainha induzida por HJ e operárias de *M. scutellaris* (Figura 12; G-I). Todos são

indivíduos recém emergidos. Foi atentado para o fato de que em rainha induzida, uma certa porcentagem dos núcleos correspondiam a indivíduos que naturalmente se desenvolveriam em rainhas, independente do tratamento e isso foi considerado na análise.

O volume da heterocromatina (Figura 13A) e volume total do núcleo (Figura 13B) nas células de *corpora allata* de rainha natural e rainha induzida por tratamento com HJ foram comparados.

Não se constatou diferença significativa entre os indivíduos para volume da heterocromatina ou do núcleo das células.

As imagens de microscopia permitiram visualizar diferenças de disposição da heterocromatina entre núcleos de rainha (natural e induzida) e de operária. A dispersão da heterocromatina em núcleos de *corpora allata* de rainha induzida por HJ é semelhante à apresentada pela operária.

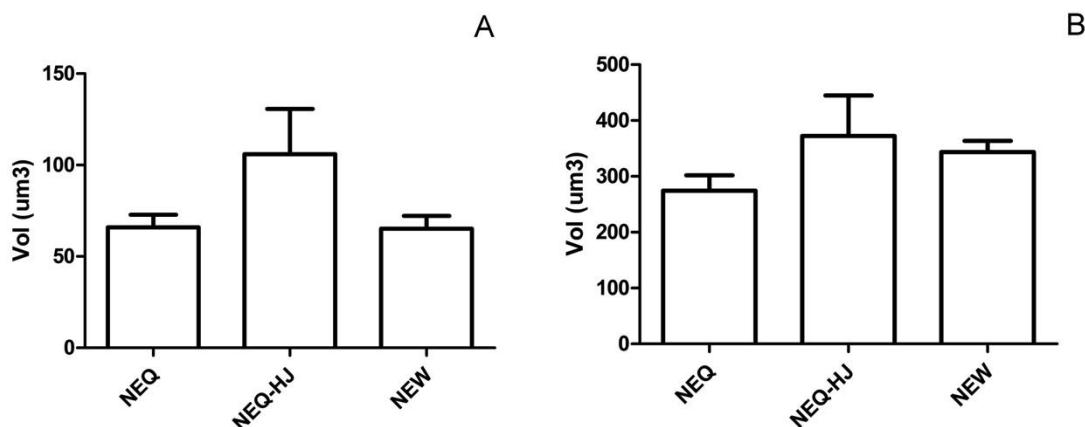


Figura 13: Representação gráfica (média e desvio padrão) do volume de heterocromatina (A) e volume total de núcleos (B) de células de *corpora allata* de *Melipona scutellaris*. NEQ = Rainha recém emergida; NEQ-HJ = Rainha Induzida por tratamento com Hormônio Juvenil recém emergida e NEW = Operária recém emergida.

7. Discussão

A regulação da expressão gênica é a base da diferenciação celular e do funcionamento balanceado dos diferentes tipos celulares em um organismo multicelular. A atividade de transcrição em cada célula depende do estado da cromatina, que é estruturalmente distinta em regiões de transcrição ativa.

Se metilação está associada ao ligar e desligar de genes, é possível que, em mecanismo diferenciação de castas que envolve várias cascatas gênicas, fatores epigenéticos tenham papel relevantes.

Para analisar um possível papel epigenético na produção de castas em *Melipona scutellaris*, núcleos de células dos *corpora allata* foram comparados, a partir de imagens capturadas por microscopia confocal e analisadas por reconstrução computacional quanto ao volume total do núcleo, volume e dispersão da heterocromatina em rainha recém emergida (natural e induzida por tratamento com Hormônio Juvenil) e operária (recém emergida, nutridora e forrageira).

Os *corpora allata* foram o alvo da investigação do presente trabalho por serem o local de síntese de Hormônio Juvenil (HJ) hormônio responsável pela estimulação de genes casta-específicos, conforme já evidenciado em vários estudos (Hartfelder & Engels, 1988; Bonetti et al., 1994, 1995; Barchuk et al., 2007).

Optamos por microscopia confocal para realizar cortes virtuais com laser nos *corpora allata* e montagem da estrutura tridimensional por sobreposição das imagens, utilizando algoritmos e softwares específicos. O processamento das imagens por reconstrução tridimensional permitiu concluir sobre as semelhanças e diferenças nos núcleos das células dos *corpora allata* dos indivíduos analisados (Figura 14).

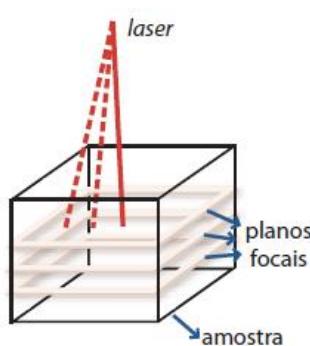


Figura 14. Imagem simplificada de obtenção de dados tridimensionais por microscopia confocal. Como não há necessidade de cortes físicos, um laser varre toda a amostra (tracejados em vermelho), focando somente um ponto por vez, ao longo de um plano a uma profundidade específica (plano focal). Fonte: Travençolo, 2007.

Imagens de fotomicrografia mostram os *corpora allata* de *Scaptotrigona postica* como órgãos arredondados formados por uma massa celular compacta bem delimitada por membrana fina (Figura 15, Cruz-Landim, 2009) assim como obtivemos por miscroscopia confocal (Figura 9B) em adulto recém emergido de *M. scutellaris*.

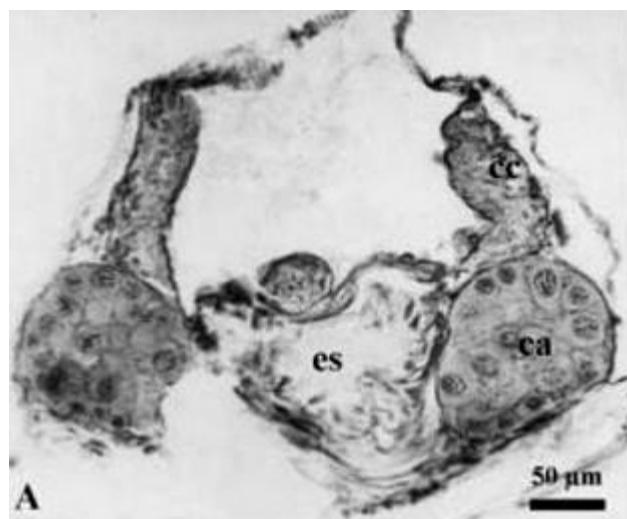


Figura 15. Fotomicrografia dos *corpora cardíaca* (cc) e *copara allata* (ca) ao lado do esôfago (es) em larva de 3º estágio de *Scaptotrigona postica*. Fonte: Cruz-Landim (2009).

Os dados de reconstrução tridimensional de núcleos de *corpora allata* mostraram diferença morfológica entre os núcleos de rainha natural e operária, sendo os de rainha natural de formato mais ovalado do que os de operárias (Figura 10 A-B). O volume total do núcleo mostrou diferença significativa entre as castas, com menor volume para os núcleos de *corpora allata* de rainha (Figura 11B). Isso corrobora com a diferença visual de dispersão da heterocromatina que, em rainha, fica mais condensada na porção central do núcleo. O volume total da glândula, porém, é maior em rainha do que operária de *M. scutellaris* (não mostrado) assim como ocorre em *A. mellifera*, onde as glândulas de rainha são maiores do que as de operária e macho (Salomao, 1977, *apud* Cruz-Landim, 2009).

O volume de heterocromatina nos núcleos de *corpora allata* de rainha natural e de operária (Figura 11A) não mostrou diferença significativa entre as castas, porém, é possível visualizar diferenças na dispersão dela. Nas rainhas, a heterocromatina está concentrada na região central do núcleo enquanto que nas operárias observa-se dispersão irregular da heterocromatina (Figura 10C-D; Figura 12G e I). Isso, talvez, esteja relacionado à expressão diferencial de genes nas castas.

Apesar de não haver diferença no volume de heterocromatina nos núcleos, a diferença no volume total do núcleo e da dispersão da heterocromatina entre rainhas e operárias pode indicar eventos epigenéticos além dos genéticos envolvidos na diferença de atividade e de expressão gênica nos *corpora allata*, para a diferenciação em fêmea completa.

Mampumbu & Mello (2006) investigaram, em núcleos de *M. rufiventris* e *M. quadrifasciata*, a metilação de DNA em associação com análise de imagens e concluíram que a cromatina em diferentes compartimentos do núcleo pode induzir silenciamento gênico.

A dispersão da heterocromatina e os mecanismos epigenéticos podem ser agentes efetivos de regulação da expressão gênica em eucariotos. A molécula de DNA e as histonas associadas a ele podem sofrer modificações, responsáveis pela remodelagem da cromatina e ativação ou inativação de regiões do genoma. Fatores associados aos mecanismos mediados por ncRNAs podem recrutar complexos de metilação, promovendo a formação de heterocromatina e

silenciamento gênico (Djupedal & Ekwall, 2009). Uma característica da heterocromatina é sua habilidade de se propagar *in cis* (Jones & Takai, 2001) e assim, alterar a expressão gênica na região para onde se espalhou, independente da sequência de nucleotídeos do DNA.

É preciso lembrar que silenciamento gênico mediado por heterocromatização do DNA não é regra geral, em *Drosophila*, por exemplo, há genes dentro de regiões heterocromáticas que são ativamente transcritos (Yasuhara & Wakimoto, 2008; Miklos & Maleszka, 2011).

As abelhas estão expostas a vários ambientes dentro e fora da colmeia e podem sofrer diferentes influências do meio, principalmente quanto à oferta de alimento. Isso pode explicar a diferença observada entre operárias recém emergidas quando comparadas às nutridoras e forrageiras (Figura 8). O maior volume de heterocromatina e do núcleo total nas operárias recém emergidas sugerem maior condensação da heterocromatina e consequente menor expressão gênica nelas do que nas nutridoras e forrageiras, o que é coerente com o fato de nutridoras e forrageiras desempenharem atividades mais especializadas do que quando emergem. Os títulos de HJ obtidos por Santana (2007) em operárias recém emergidas, nutridoras e forrageiras de *M. quadrifasciata* suportam nossa hipótese, pois nutridoras e forrageiras apresentam títulos de HJ mais alto do que as operárias recém emergidas.

As condições ambientais tem impacto no epigenoma por meio da exposição à condições externas que provocam adição ou remoção de grupamentos ao DNA ou histonas ou, ainda, ativação de ncRNAs. A metilação do DNA parece ser suscetível a modificações da dieta (Ford, 2013).

A influência dos efeitos genotípicos e ambientais nas castas varia entre espécies, desde fenótipos controlados amplamente pelo ambiente até sistemas quase que somente genéticos (Schwander et al., 2010).

Sabe-se que, em *Melipona*, larvas abaixo de um peso crítico devido à insuficiência de alimento na natureza, não se transformam em rainhas, mesmo que tenham genótipo compatível para isso (Bonetti, 1982, 1983; Mackert et al., comunicação pessoal). A disponibilidade de alimento e o consequente peso da larva durante o período crítico para diferenciação de castas nessas abelhas

podem influenciar os mecanismos epigenéticos? Há uma interação entre genoma, alimento e epigenoma em *Melipona*?

Barchuk et al.(2007) mostraram, por meio de micro-arranjos de DNA, que a diferenciação de castas em *A. mellifera* está relacionada com aumento de genes envolvidos no metabolismo de rainhas e à ativação de “genes novos” em operárias, sugerindo regulação das taxas de HJ nos *corpora allata*, em função do alimento ingerido pela larva que, ao final de uma via de sinalizações, aumenta ou não a síntese de HJ nessas glândulas.

Kucharski et al. (2008) demonstraram que o *knockdown* da expressão da metiltransferase de novo DNMT3, chave no processo de modificação epigenética, é capaz de alterar a cromatina, promovendo reprogramação epigenética global em *A. mellifera* e mimetizando o resultado da alimentação diferencial, com produção de rainhas a partir das larvas submetidas a RNAi para o gene codificador da metiltransferase. Esse resultado demonstrou que a perturbação da regulação, pela *down* regulação da DNA metiltransferase, durante o desenvolvimento, levou à mesma trajetória que a dieta com geléia real levaria (Miklos & Maleszka, 2011).

Muitas vezes, o silenciamento gênico, via remodelagem da cromatina, é decorrente do *cross-talk* entre a metilação do DNA e da histona (Tamura & Selker, 2001; Grewal e Moazed, 2003). A estrutura da cromatina, definida pela metilação do DNA e modificação das histonas, é reversível e permite ajustes de transcrição em resposta às mudanças de condições ou sinais ambientais (Chittka & Chittka, 2010). Os fatores epigenéticos tem potencial para se tornar a ponte entre o genoma e o fenótipo (Lyko & Maleska, 2011).

Nesse contexto, as abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* detém um potencial a ser explorado. Devido à interface dos indivíduos com os diferentes ambientes, podemos sugerir um *cross-talk* entre a genética (componentes genéticos responsáveis pela diferenciação de castas) os fatores ambientais (alimento) e a epigenética para ativação ou silenciamento de genes casta-específicos em *M. scutellaris*.

Tem sido cada vez mais aceito que as interações gene-ambiente são influenciadas por modificações reversíveis do DNA, via processos de

metilação/demetilação do DNA e modificações pós-traducionais das histonas (Feil & Fragga, 2012; Dickman et al., 2013).

O perfil de heterocromatina obtido por análise de imagens permitiu distinguir rainha de operária (Figura 12) porém, a rainha induzida por HJ apresentou padrão de heterocromatina semelhante ao de operária e diferente do verificado em rainha natural.

Apesar das significativas semelhanças morfológicas entre rainha induzida por HJ e natural (Campos et al., 1975; Campos, 1979, 1979b; Bonetti, 1982, 1984; Bonetti et al., 1994, 1995) não foi obtido sucesso, até o momento, no estabelecimento de mini colônias de *Melipona* com as rainhas induzidas (Kerr; Campos; Bonetti, comunicação pessoal).

Os resultados do presente trabalho podem ser uma explicação para isso. Rainhas naturais e induzidas por tratamento com HJ embora apresentem igual volume de núcleo e de heterocromatina, rainhas induzidas apresentam padrão semelhante ao de operárias quanto à dispersão da heterocromatina, sugerindo diferença de expressão gênica, o que pode justificar o resultado obtido anteriormente. Rainha induzida pode ter o mesmo volume de núcleo e de heterocromatina de operária, porém, o pulso inicial de HJ que desencadeou nela estruturas de rainha não foi suficiente para torna-la fisiologicamente uma fêmea completa, devido ao fato de seus *corpora allata* não manterem uma produção constante e suficiente de HJ.

Judice et al.(2006) mostraram níveis significativos de diferenças de expressão de genes casta-específicos em rainha induzida e natural de *M. quadrifasciata*, que poderiam ser responsáveis por fenômenos fisiológicos, impedindo que essas rainhas sejam funcionais quando maduras.

A diferença entre o volume total de núcleo de *corpora allata* de rainha e de operária foi estatisticamente significativa (Figura11) porém, quando na comparação é introduzida a medida de volume de núcleo de rainha induzida por HJ, a diferença entre a rainha (natural e induzida) e operária não é significativa, porém, é possível perceber uma tendência de maior volume em operária e em rainha induzida por HJ do que em rainha (Figura 13). Diferença significativa foi detectada quando se comparou rainha e operária (Figura 11B). É possível que o *n*

amostral não tenha sido suficiente para estabelecer uma diferença clara e estatisticamente significativa entre rainha natural, induzida e operária.

Núcleos de células de *corpora allata* com menor volume em rainhas do que em operárias comportam o mesmo volume de heterocromatina (Figura 11A), o que corrobora com os resultados de diferença de dispersão da heterocromatina nas castas (Figuras 10 C-D; 12G e I). Esses resultados indicam que associado à diferença no genótipo, a remodelagem da cromatina pode ser utilizada como meio de controlar a produção de transcritos necessários em função das condições alimentares da larva. A diferença no espalhamento da heterocromatina pode ser associada à diferença de expressão gênica nas rainhas e operárias?

O estado da cromatina tem efeitos marcantes na expressão gênica e é possível que contribua para o estabelecimento e manutenção da identidade celular, tanto que transições de desenvolvimento são acompanhadas por mudanças dinâmicas do estado da cromatina (Chen & Dent, 2014).

Os genes não estão sempre ligados ou desligados em uma das castas, eles podem estar expressos em níveis baixos ou moderados, diferencialmente expressos, fortalecendo a hipótese de que uma regulação sutil dos passos metabólicos e expressão diferencial de genes afetam a capacidade reprodutiva e metabólica e os diferentes padrões de comportamento encontrados nas rainhas e operárias (Chittka & Chittka, 2010).

Em *A. mellifera*, a porcentagem de metilação em gene específico analisado foi maior em cabeças de larvas do que no corpo total, tanto em operárias quanto em rainhas, o que os autores relacionaram com o processo replicativo do DNA em *corpora allata* e células neurosecretoras (Kucharski et al., 2008). Foret et al (2012) mostraram que o número de genes diferencialmente metilados (DMGs) em cabeças de larvas é significativamente maior do que no cérebro adulto, associando a metilação com a expressão de genes relacionados ao hormônio juvenil, insulina, hormônios reguladores de determinação de casta.

Kerr et al. (1975) mostraram que *corpora allata* de rainha tem maior número de células e maior volume total do que o de operárias de mesma idade. Baseado na correlação entre o número de células e o volume da glândula em pool de rainhas, esses autores concluem que todas ou quase todas as células estão sintetizando HJ.

As pesquisas tem mostrado que embora o genoma seja o mesmo em todas as células de um organismo, o epigenoma é diferente para cada tipo celular.

As modificações epigenéticas podem estar embasando as diferenças de expressão gênica na produção de rainhas e operárias, em associação aos fatores genéticos e alimentares.

Trabalhos de nosso grupo demonstraram, em corpo gorduroso de *M. scutellaris*, a presença de transcritos relacionados à maquinaria epigenética (Sousa et al., 2013) e resultados recentes confirmam a presença de enzimas epigenéticas DNMT1 e DNMT2 (Cardoso-Junior, comunicação pessoal).

Apesar dos promissores resultados obtidos, o papel da epigenética e da remodelagem da cromatina em abelhas sem ferrão *Melipona* não está ainda claro o suficiente para embasar diferenças de expressão gênica casta-específica. Uma hipótese é que os mecanismos epigenéticos representem uma ponte entre os fatores genéticos e os ambientais, desencadeando expressão gênica casta-específica.

Controle epigenético destaca-se como mecanismo potencial para controle da expressão gênica em abelhas, regulando diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais que resultam na determinação e diferenciação em rainhas e operárias.

Modificação do DNA por metilação é um mecanismo antigo e amplamente utilizado, presente nos Metazoa e tem sido apontado como responsável por diversas funções nos organismos modernos, desde regulação da expressão gênica, diferenciação celular até silenciamento de transposons, porém, a trajetória completa desde a alteração por metilação até a produção do fenótipo é, ainda, indireta e desconhecida (Lyko et al., 2010).

Quais genes estariam expressos/silenciados em rainhas e operárias de *Melipona scutellaris* em função dos efeitos de enzimas epigenéticas? Essa é uma questão que se levanta e que somente poderá ser respondida após a conclusão do genoma dessa espécie, que se encontra em processo de sequenciamento, o que dará *background* para novas análises.

Pesquisas revelam que a metilação pode ter papel chave na regulação da plasticidade de fenótipos nos insetos, sugerindo que os insetos são particularmente interessantes para avançar no entendimento das funções

biológicas da metilação do DNA (Glastad et al. 2011, Foret et al., 2012) o que nos leva considerar *Melipona* um ótimo organismo para estudos de metitransferases e de epigenética e continuar utilizando essas abelhas sem ferrão como material biológico de investigação.

Esses são resultados do primeiro trabalho que investiga o padrão da heterocromatina em rainhas e operárias de *Melipona scutellaris* para associar à diferenciação de castas.

8. Conclusões

Núcleos de células de *corpora allata* de operária (recém emergida, nutridora e forrageira) e de rainha (natural e induzida por tratamento com Hormônio Juvenil) de *Melipona scutellaris* foram marcados com sonda de fluorescência YOPRO e comparados a partir de imagens capturadas por microscopia confocal e analisadas por reconstrução computacional. Com base nos resultados concluímos que:

- Os núcleos de células de *corpora allata* de rainha apresentam formato mais ovalado do que os de operária.
- O volume total do núcleo e da heterocromatina é significativamente maior em operária recém emergida do que em nutridora e forrageira.
- Entre operárias nutridoras e forrageiras não há diferença de volume de núcleo e de heterocromatina.
- Operária recém emergida apresentou volume total de núcleo de célula de *corpora allata* maior do que o de rainha recém emergida.
- Em rainha e operária recém emergidas não há diferença quanto ao volume de heterocromatina, porém, é possível visualizar diferença de dispersão da heterocromatina.
- Não há diferença quanto ao volume total do núcleo e da heterocromatina entre operária, rainha e rainha induzida por tratamento com Hormônio Juvenil (HJ).
- A dispersão da heterocromatina em núcleos de células de *corpora allata* de rainha induzida por HJ apresenta padrão semelhante ao de operária.

9. Referencias Bibliográficas

Amaral, I.M., Moreira Neto, J.F., Pereira, G.B., Franco, M.B., Beletti, M.E., Kerr, W.E., Bonetti, A.M. & Ueira-Vieira, C. (2010) Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. *Micron*, 41, 123-129.

ASTM STANDARDS (2002). Recommended practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solution. ASTM E 104-02. West Conshohocken: American Society for Testing Materials.

Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G. & Simões, Z.L.P. (2002) Effects of juvenile hormone and ecdysone on the initiation of vitellogenin syntheses of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. In *J Insect Sci*, 1. Available on line inestsscienc.org/2.1.

Barchuk, A.R.; Cristino, A.S.; Kucharski, R.; Costa, L.F.; Simões, Z.L.P; Maleszka, R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.*, 7: 70.

Bonetti, A.M. (1982) Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em *Melipona* (Hymmenoptera, Apidae, Meliponini). Mestrado, FMRP/USP, 140 p.

Bonetti, A.M. (1983) Action of Juvenile Hormone on gene expression in *Melipona* (Hymmenoptera, Apidae, Meliponidae). *Revista Brasileira de Genética*, 4 (VI) 583.

Bonetti, A.M. (1984) Efeitos do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Biologia*, 4(44), 509-518.

Bonetti, A.M. (1990) Genética da Determinação de Casta em *Melipona*. Ação do Hormônio Juvenil sobre a Estareses e Corpora Allata durante desenvolvimento Pós-Embrionário. Tese Doutorado, FMRP/USP. 165p.

Bonetti, A.M., Cruz-Landim, C. da & Kerr W.E. (1994) Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. *J. Apicultura Res.*, 1 (33), 11-14.

Bonetti, A.M., Kerr W.E. & Matusita, S.H. (1995) Effects of Juvenile Hormone I, II, III in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. *Revista Brasileira de Biologia*, 1 (55), 113-120.

Bonetti, A.M., Siquieroli, A.C.S., Santana, F.A., Vieira, C.U., Bezerra, M., Pereira, G.B., Simões, Z.L.P. & Cruz-Landim, C. da (2006) Effect of juvenile hormone III on the ultrastructure of the corpora allata in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Braz. J. Morphol. Sc.: Functional Anatomy and Cell Biol*, 23 (4), 393-400.

Camargo, C.A.; Almeida, M.G.; Parra, M.G.M. & Kerr, W.E. (1976). Genetics of sex Determination in bees. IX. Frequencis of queen and worker from larvae under controlled conditions (Hymenoptera: Apoidea) *J.Kansas Entomol. Soc.* 49 (1), 120-125.

Campos, L.A.O. (1978) Sex determination in bees. VI. Effect of a Juvenile Hormone analogue in males and females of *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *J Kansas Entom Soc*, 51 (2), 228-234.

Campos, L.A.O. (1979) Determinação do sexo nas abelhas XIII. Determinação das castas em *Partamona cupira* (Hymenoptera, Apidae). Papel do Hormônio Juvenil. *Ciência e Cultura*, 31 (1), 65-70.

Campos, L.A.O. (1979b) Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do hormônio juvenil na diferenciação das castas na subfamília Meliponinae. *Revista Brasileira de Biologia*, 39 (4), 965-971.

Chen, T. & Dent, S.Y.R. (2014) Chromatin modifiers and remodelers: regulators of cellular differentiation. *Nature Review / Genetics* 15, 93-106.

Chen, D., Diao, L. and Eulensteine, O. et al. (2003) Flipping: A supertree construction method. In Janowitz, M., Lapoint, F.J., McMorris, F.R., Roberts, F.S.,

eds. Bioconsensus. DI-MACS Series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science. American Mathematical Society, 61: 135–60.

Chittka, A. & Chittka L. (2010) Epigenetics of royalty. PLoS Biol. 8(11) e1000532.

Cruz-Landim, C. da (2009) Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas. São Paulo, UNESP ed., 408 p.

Dickman, M.J.; Kucharski, R.; Maleszka, R.; Hurd, P.J. (2013) Extensive histone post-translational modification in honey bees. Ins. Biochem. Mol. Biol. 43, 125-137.

Djupedal, I. & Ekwall, K. (2009) Epigenetics: heterochromatin meets RNAi. Cell Res. 19, 282-295.

Engels, W., Kaatz, H., Zillikens, A., Simões, Z.L.P., Trube, A., Braun, R. & Dittrich, F. (1990) Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: Hoshi, M. & Yamashita, O. Advances in Invertebrate Reproduction, 5, Elsevier, Amsterdam.

Evans, J.D. & Wheeler, D.E. (2000). Expression profiles during honeybee cast development. Genome Biol. 2,6p.

Feil, R. & Fragga, M.F. (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. Nature Rev. Genet. 13, 97-109.

Fischler, W.; Wang, Y.; Allis. C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. Curr. Opin. Cell Biol. 15, 172-183.

Ford, D. (2013) Honeybees and cell lines as models of DNA methylation and aging in response to diet. Experimental Gerontology 48, 614-619.

Foret, S.; Kucharski, R.; Pellegrini, M.; Feng, S.;Jacobsen, S.E.; Robinson, G.E.; Maleszka, R. (2012) DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. PNAS 109 (13) 4968-4973.

Frommer, M.; McDonald, L.E. Millar, D.S.; Collis, C.M.; Watt, F.; Grigg, G.W. Molloy, P.L; Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5 methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (5) 553-565.

Gilbert, L.I. (2005). Comprehensive Molecular Insect Science, 7, Volume Set, USA, Elsevier Pergamon. Available online Science Direct (www.info.sciencedirect.com).

Gifford, C.A.; Ziller, M.J.; Gu, H. et al. (2013) Transcriptional and Epigenetic Dynamics during Specification of Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* 153, 1149-1163.

Glastad, K.M.; Hunt, B.G.; Yi, S.V.; Goodisman, M.A.D. (2011) DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol. Biol.* 20(5),553-565

Greer, E.L.; Maures, T.J.; Duygu, U.; Hauswirth, A.G.; Mancine, E.; Lim, J.P. Benayoun, B.A..; Shi, Y. & Brunet, A. (2011). Transgerational epigenetic inheritance of longevity in *C. elegans*. *Nature* 000. 1-7, doi10.1038. On line.

Grewal, S.L. & Moazed D. (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science.* 301 (5634), 798-802.

Grewal, S.I. & Songtao, J. (2007) Heterochromatin revisitad. *Nature. Rev. Genetic.* 8, 35-46.

Hammock, B.D. (1985) Regulation of juvenile hormone titer: degradation. In: Kerkut, G.A. Gilbert L.I. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 7, Pergamon, Oxford, 431-472.

Hartfelder, K. & Engels, W. (1988) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr Top Dev Biol*, 40, 45-77.

Hepperle, C. & Hartfelder, K. (2001) Differentially expressed regulatory genes in honeybee caste developments. *Naturwissenschaften.* 88, 113-116.

Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in câncer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415-428.

Jones, P.A. & Takai, D. (2001) The rol of DNA methylation in Mamalian Epigenetics. *Science*. 293, 1068-1107.

Judice, C.; Hartfelder, K.; Pereira, G.A.G. (2004) Caste-specific gene expression profile in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* - Are there common patterns in highly eusocial bees? *Insectes Soc.* 51, 352–358.

Judice, C.; Carazolle, M.; Festa, F.; Sogayar, M.C.; Hartfelder, K.; Pereira, G.A.G. (2006) Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee. *Insect Mol Biol*, 15, 33-44.

Kerr, W.E. (1975) Evolution of the population structure in bees. *Genetics* 79, 73-84.

Kerr W.E. (1976) Genetica da determinação do sexo em abelhas. X. Programação da atividade dos genes determinadores do sexo e casta. *Ann. 3 Cong. Bras. Apic.*, 179-187.

Kerr, W.E. & Nielsen, R.A. (1966) Evidences that genetically determined melipona queens can become workers. *Genetics*, 54, 859-866.

Kerr, W.E. ; Akahira, Y. & Camargo, C.A. (1975) Sex determination in bees. IV. Genetic control of Juvenile Hormone production in *Melipona quadrifasciata* (Apidae). *Genetics*. 81,749-756.

Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S. & Maleszka, R. (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827-1830.

Lattorff, H.M.G. & Moritz, R.F.A. (2013) Genetic underpinnings of division of labor in the honeybee (*Apis mellifera*). *Trends in Genetics* 29 (11), 641-648.

Lockett, G.A.; Helliwell, P.; Maleszka, R. (2010) Involvement of DNA methylation in memory processing in the honey bee. *Neuroreport* 21, 812-816

Lyko, F.; Foret, S, Kucharski, R.; Wolf, S.; Falckenhayn, C.; Maleszka R. (2010) The honeybee Epigenomes: Differential Methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* 8 (11) 1-12 e 1000506 doi 10.1371.

Lyko, F. & Maleszka, R. (2011). Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends in Genetics*, 27 (4), 127-131.

Mampumbu, A.R. & Mello, M.L. (2006) DNA methylation in stingless bees with low and high heterochromatin contents as assessed by restriction enzyme digestión and image análisis. *Citometry Part A*, 986-991.

Miklos, G.L.G.; Maleszka, R. (2011) Epigenomic communication systems in humans and honey bees: From molecules to behavior. *Horm. Behav.* 59 (3), 399-406.

O'Neil, R.J.W.; O'Neil, M.J., Grave J.A.M. (1988) Undermethylation assoscited with retroelement activation and chromosome remodeling in an interespecific mammalian hybrid. *Nature* 393, 68-72.

Portela, A. & Esteller, M. (2010) Epigenetic modifications and human diases. *Nature Biotech.* 28(10) 1057-1068.

Rocha, M.P. & Pompolo, S.G. (1998). Karyotypes and heterochromatin variation (C-banding) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Genet. Mol. Biol.* 21, 41-45.

Rocha, M.P.; Pompolo, S.G; Dergam, J.A.; Fernandes, A. & Campos, L.A.O. (2002). DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). *Hereditas* 136, 19-27.

Santana, W.C. (2007) *Papel do sistema endocrino na reprodução e divisão de trabalho em operárias de Melipona quadrifasciata (Apidae, Meliponini)*. Ribeirao Preto-SP. FFCLRP/USP, Tese de Doutorado, 9p.

Schaefer, M. & Lyko, F. (2007) DNA methylation with a sting: an active DNA methylation system in the honeybee. *BioEssays*. 29, 208-211.

Schwander, T.; Lo, N.; Beekman, M.; Oldroyd, B.P.; Keller, L. (2010) Nature versus nurture in social insect caste differentiation. *Trends in Ecology and Evolution* 25 (5), 275-282.

Siquieroli, A.C.S.; Vieira, C.U.; Carvalho-Zilse, G.A.; Goulart, L.R.; Bonetti, A.M.; Kerr, W.E. (2009) Analysis of the Intercastes Transcriptional Profile of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by mRNA Differential Display. *Biol. Res.* 42, 107-110.

Snodgrass, R.E. (1956) Anatomy of the honeybee. UK Ithaca & London, Comstock Publishing Associates, 334p.

Sousa, C.S.; Serrão, J.E.; Bonetti, A.M.; Amaral, I.M.R.; Kerr, W.E.; Maranhão, A.Q.; Ueira-Vieira, C. (2013) Insights into the *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) fat body transcriptome. *Genetics and Mol. Res.* 36 (2), 292-297.

Tamuru, H. Selker E.U. (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*. 414, 277-283.

Travençolo, B.A.N. (2007) Métodos computacionais para a caracterização e análise da relação entre anatomia e expressão gênica em sistemas biológicos. USP. Tese de Doutorado, Bioinformática. 117p.

Vieira, C.U.; Bonetti, A.M.; Simões, Z.L.P.; Maranhão, A.Q.; Costa, C.S.; Costa, M.C.R.; Siquieroli, A.C.S.; Nunes, F.M.F. (2008) Farnesoic Acid O-Methyl Transferase (FAMeT) isoforms: conserved traits and gene expression patterns related to caste differentiation in the stingless bee, *Melipona scutellaris*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 67, 97-106.

Wang, Y.; Jorda, M.; Jones, P.L.; Maleszka, R.; Ling, X.; Robertson H.M.; Mizzen, C.A.; Peinado, M.A.; Robinson, G.E (2006) Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314, 645-647.

Wigglesworth, V. B., (1970) Insect hormones. S. Francisco, USA, W.R. Reeman.

Yasuhara, J.C. & Wakimoto, B.T. (2008) Molecular landscape of modified histones in *Drosophila* heterochromatin genes and euchromatin-heterochromatin transition zones. *PLoS Genet.* 4(1), 16. e www.plosgenetics.org