



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise epigenética e metabólica da diferenciação de castas em *Melipona*  
*scutellaris***

**Aluna:** Luiza Diniz Ferreira Borges

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti – IBTEC/UFU

**Coorientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira – IBTEC/UFU

UBERLÂNDIA - MG  
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise epigenética e metabólica da diferenciação de castas em *Melipona*  
*scutellaris***

**Aluna:** Luiza Diniz Ferreira Borges

**Orientadora:** Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti – IBTEC/UFU

**Coorientador:** Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira – IBTEC/UFU

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  
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B732 Borges, Luiza Diniz Ferreira, 1995-  
2019 Análise epigenética e metabólica da diferenciação de castas em  
Melipona scutellaris [recurso eletrônico] / Luiza Diniz Ferreira  
Borges. - 2019.

Orientadora: Ana Maria Bonetti .  
Coorientador: Carlos Ueira-Vieira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2506>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. , Ana Maria Bonetti, 1949-, (Orient.). II. Ueira-  
Vieira, Carlos, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de  
Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Dezoito de dezembro de 2019.	Hora de início:	14:40h	Hora de encerramento:	15:20h
Matrícula do Discente:	11722GBI005				
Nome do Discente:	Luiza Diniz Ferreira Borges				
Título do Trabalho:	Análise epigenética, proteica e metabólica da diferenciação de castas em <i>Melipona scutellaris</i> .				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Genética, Biologia e Melhoramento de Plantas e Animais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Análise epigenética em <i>Melipona</i> (Apidae, Meliponini): efeitos de desacetilase de histonas na organização da cromatina.				

Reuniu-se no Bloco 2E, sala 211, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Assim composta: Professores Doutores: Ana Maria Bonetti (Orientadora), Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder e Prof. Dr. José Eduardo Serrão. A participação dos dois últimos se deu por epistola.

Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa Ana Maria Bonetti apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epistolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada leitura das epistolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o (a) candidato (a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria Bonetti, Presidente**, em 18/12/2019, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **José Eduardo Serrão, Usuário Externo**, em 19/12/2019, às 08:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Klaus Hartmann Hartfelder, Usuário Externo**, em 19/12/2019, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1711601** e o código CRC **83316961**.

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise epigenética e metabólica da diferenciação de castas em *Melipona scutellaris***

**ALUNA:** Luiza Diniz Ferreira Borges

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti – IBTEC/UFU  
(Orientadora)

**Examinadores:** Prof. Dr. José Eduardo Serrão – DBG/UFV  
Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder – FMRP/USP

**Data da Defesa:** 18/12/2019

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti

Dedico aos meus pais, Renata e Gilberto (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus pela vida e por ter sido sempre minha maior força e amparo.

Agradeço aos meus pais, Renata e Gilberto (*in memoriam*), que nunca mediram esforços na criação de seus filhos, buscando sempre ensinar sobre amor, respeito, dedicação e ética. Foram eles que me mostraram a importância da educação, do trabalho árduo e de realizar cada pequena tarefa com amor. Agradeço por terem sempre fomentado minha curiosidade e me apoiado na escolha de ser pesquisadora. Durante a realização desse trabalho, minha mãe se desdobrou em mil, procurando me ajudar e me apoiar em todas as inúmeras dificuldades. Seu apoio, sua palavra amorosa, sua dedicação, sua fé e seu colo foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Não tenho palavras para agradecer todo seu amor e dedicação. Tenho a certeza que de onde estiver meu pai sempre me guardou e me protegeu nesse caminho.

Agradeço à toda minha família que sempre teve uma palavra de motivação e um abraço consolador disponíveis. Agradeço em especial, ao meu irmão, Victor, pela sua ponderação, seus conselhos e por me fazer acreditar que juntos superaríamos todos os obstáculos.

Agradeço aos meus amigos de escola, Gabi Rassi, Jamila, Alvaro, Luiz, Tulio, Paula, Helena e Gabi Attie, pelo carinho, alegrias divididas e por serem tão compreensivos nesse momento. Agradeço aos meus meninos Gustavo, Raphael e Paulo por não cansarem de me ensinar o sentido da palavra amizade. Agradeço aos amigos que “roubei” da Laís e do Victor por tornarem tudo mais leve e divertido.

Agradeço aos amigos do Labgen pelo trabalho em equipe, boa convivência, tristezas e alegrias compartilhadas diariamente. Agradeço à Tamiris e à Jéssica, minhas “irmãs” mais velhas, que sempre estiveram a cuidar de mim dentro e fora do laboratório. Agradeço à Letícia, minha gêmea alemã, por tantas conversas e



sonhos compartilhados. Agradeço imensamente à Serena pela ajuda com os experimentos, pela parceria, pelos conselhos. Vocês foram essenciais nessa etapa. Agradeço também ao Luiz, Michelle, Rafael, Victoria, Lucas, Natalia, Matheus, Mariana, Carol, Laís, Romualdo, Carlos Jr pela amizade. Agradeço às amigas que já deixaram o Labgen: Patrícia, Aninha e Luana.

Agradeço aos amigos de profissão e companheiros de jornada, Emilia, Jessica Brito, Lorena, Adriele, Aline e Vitor. Agradeço aos professores e funcionários da UFU pelos ensinamentos e convivência diária.

Agradeço finalmente à minha orientadora, Dra. Ana Maria Bonetti, e ao meu coorientador, Dr. Carlos Ueira Vieira. Vocês me ensinaram a fazer ciência com ética e comprometimento, despertarem meu amor pela Genética e pelas abelhas sem ferrão. Nunca mediram esforços para auxiliar no meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço por terem confiado no meu trabalho e, ao longo desses seis anos, terem se tornados meus eternos mãe e pai científicos.

Agradeço aos membros da banca pela atenção em avaliar esse trabalho e as considerações valiosas.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Material Biológico.....	16
3.2 Tratamentos.....	18
3.2.1 Tratamento de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> com Hormônio Juvenil III.....	18
3.2.2 Tratamento de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> com Ácido 10-hidróxi-2Edecenóico.....	19
3.3 Análise da Expressão Gênica.....	20
3.3.1 Extração de RNA total.....	20
3.3.2 Síntese de cDNA.....	21
3.3.3 Análise por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR).....	21
3.4 Metabolômica.....	23
3.4.1 Preparação das Amostras.....	24
3.4.2 Cromatografia Gasosa de Alta Performance Acoplada à Espectrometria de Massa.....	24
3.5 Análises Estatísticas.....	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
4.1 Análise da Expressão dos Genes Codificadores de Histonas Desacetilases e Histona Acetiltransferase em <i>Melipona scutellaris</i> ....	26
4.1.1 Níveis de Transcritos dos Genes <i>hdac1</i> , <i>hdac4</i> e <i>kat2a</i> em Larvas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	26
4.1.2 Níveis de Transcritos dos Genes <i>hdac1</i> , <i>hdac4</i> e <i>kat2a</i> em Pupas e Adultos Recém Emergidos de Operárias de <i>Melipona</i> <i>cutellaris</i> .....	29

4.1.3 Níveis de Transcritos dos Genes <i>hdac1</i> , <i>hdac4</i> e <i>kat2a</i> em Pupas e Adultos Recém Emergidos de Rainhas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	30
4.1.4 Comparação dos Níveis de Transcritos dos Genes <i>hdac1</i> , <i>hdac4</i> e <i>kat2a</i> em Pupas e Adultos Recém Emergidos entre as Castas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	31
4.2 Tratamento de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> com Hormônio Juvenil III.....	32
4.3 Tratamento de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> com Ácido 10-hidróxi-2E-decenóico.....	33
4.4 Metabolômica.....	36
4.4.1 Metabolômica de Larvas.....	36
4.4.2 Metabolômica de Alimentos.....	51
5 CONCLUSÃO.....	54
6 REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO i.....	69
ANEXO ii.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características das fases de desenvolvimento das abelhas <i>Melipona scutellaris</i> .....	16
<b>Tabela 2:</b> Sequências dos <i>primers</i> dos genes avaliados.....	22

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação esquemática de um nucleossomo, mostrando uma dupla fita de DNA enovelada em um octâmero de histonas, composto de duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As extremidades aminoterminal das histonas estão voltadas para fora do complexo do nucleossomo.....2

**Figura 2:** Representação esquemática das extremidades aminoterminal de histonas modificadas por diferentes radicais e das implicações dessas modificações na formação dos dois principais estados estruturais da cromatina: eucromatina (parte superior esquerda) e heterocromatina (parte inferior esquerda).....3

**Figura 3:** Colônia de *Melipona scutellaris*. A) Visão global da colmeia. B) Células de cria, operárias e rainha (indicada pela seta). C) Potes de mel. D) Pote de pólen.....9

**Figura 4:** Controle genético-alimentar para determinação de castas em *Melipona*, proposto por Kerr em 1948 e modificado por Silva (2011).....11

**Figura 5:** Esquema representando o desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de *Melipona scutellaris*.....18

**Figura 6:** Quantificação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em larvas de *Melipona scutellaris*. A) Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. B) Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR, após remoção de *outliers*. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn....27

**Figura 7:** Comparação dos perfis de expressão de transcritos dos genes *hdac1*, *kat2a* e *mfe* e títulos de hormônio juvenil em larvas de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes

obtida por RT-qPCR e dos títulos de hormônio juvenil obtidos por radioimunoensaio.  
Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.....28

**Figura 8:** Quantificação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de operárias de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.....29

**Figura 9:** Quantificação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de rainhas de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.....30

**Figura 10:** Níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de operárias e rainhas de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. Análise estatística: 2Way-ANOVA, pós-teste de Dunn.....31

**Figura 11:** Efeitos do tratamento de larvas de *Melipona scutellaris* no terceiro instar larval com 10HDA. A) Taxa de sobrevivência. B) Distribuição das fêmeas em castas, rainha e operária.....34

**Figura 12:** Distribuição das concentrações dos metabólitos de larvas de *Melipona scutellaris* antes (à esquerda) e depois (à direita) da normalização. *Boxplots* e gráficos de densidade de Kernel antes e depois da normalização. Os *boxplots* mostram 50 compostos devido ao limite de espaço. Os gráficos de densidade são baseados em todas as amostras.....37

**Figura 13:** Análise de Enriquecimento dos metabólitos encontrados em larvas de *Melipona scutellaris*.....38

<b>Figura 14:</b> Compostos e perfil de expressão dos genes <i>hdac1</i> , <i>mfe</i> e dos títulos de hormônio juvenil durante o desenvolvimento larval de <i>Melipona scutellaris</i> . Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.....	40
<b>Figura 15:</b> Análise de Componente Principal (PCA) de perfil metabólico de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	42
<b>Figura 16:</b> Dendograma (Distância euclidiana, algoritmo de Ward) gerado a partir do perfil metabólico de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	43
<b>Figura 17:</b> Análise de correlação de Pearson de perfil metabólico de larvas de <i>Melipona scutellaris</i> .....	44
<b>Figura 18:</b> <i>Heatmap</i> indicando os 100 metabólitos com maiores diferenças de concentração (Teste T – $P < 0.05$ ). As setas indicam os grupos de compostos.....	45
<b>Figura 19:</b> Análise de Enriquecimento dos metabólitos do Grupo 3 (metabólitos com concentrações elevadas na amostra L3-3_3) identificados pelo <i>heatmap</i> .....	46
<b>Figura 20:</b> Análise de Enriquecimento dos metabólitos do Grupo 3 (metabólitos com concentrações elevadas na amostra L3-3_3) identificados pelo <i>heatmap</i> . Cada nó representa uma função metabólica, a cor é baseada no valor de P e o tamanho no grau de enriquecimento. Duas funções metabólicas estão conectadas por uma linha, se o número de metabólitos que elas compartilham é superior a 25% do número total de metabólitos das duas funções combinadas.....	47
<b>Figura 21:</b> Integração dos metabolismos de compostos de 1 carbono, purinas, poliaminas e síntese de hormônio juvenil. Os metabólitos destacados em amarelo apresentam concentrações elevadas na amostra L3-3_3 (Grupo 3 do <i>heatmap</i> ).....	49
<b>Figura 22:</b> Análise de Enriquecimento dos metabólitos encontrados no alimento larval de <i>Melipona scutellaris</i> .....	52

**Figura 23:** Diagrama de Venn indicando o número de metabólitos compartilhados pelas amostras de alimento larval.....53



## LISTA DE ABREVIATURAS

1.  $\mu\text{g}$  – micrograma
2.  $\mu\text{L}$  – microlitros
3.  $\mu\text{M}$  – micromolar
4. 10HD2A – ácido (E)-10-hidroxi-2-decenóico
5. 4EBP – proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
6. 5,10-CH<sub>2</sub>THF – 5,10-metilenotetrahidrofolato
7. 5,10meTHF – 5,10-metilenotetrahidrofolato
8. 5mTHF – 5-metiltetrahidrofolato
9. ADP – difosfato de adenosina
10. AMP – adenosina monofosfato
11. ATP – trifosfato de adenosina
12. B12 – cobalamina
13. BHMT – betaína-homocisteína metiltransferase
14. CBS – cistationa  $\beta$ -sintase
15. cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
16. CpG – nucleotídeo citosina seguido por um nucleotídeo guanina na sequência linear de bases ao longo do sentido 5'  $\rightarrow$  3'. É a abreviação de 5'-C-fosfato-G-3'.
17. CT – ciclo de *threshold*
18. DEPC – dietil pirocarbonato
19. DNA – ácido desoxirribonucleico
20. DNase – desoxirribonuclease
21. DnMT – DNA metiltransferase
22. dNTP – dinucleotídeo trifosfato
23. dSAM – S-adenosilmetionina descarboxilada
24. DTT - ditiotretol
25. EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
26. eV – elétron/volt
27. FAMEt – *farnesoic acid O-methyl transferase*

- 28. g – grama
- 29. g – unidade de aceleração
- 30. GC/MS – cromatografia gasosa de alta performance acoplada à espectrometria de massa
- 31. GMP – guanosina monofosfato
- 32. GSH – glutathiona
- 33. H2A – histona 2A
- 34. H2B – histona 2B
- 35. H<sub>2</sub>O – água
- 36. H3 – histona 3
- 37. H3K4-Me – metilação da lisina 4 da histona 3
- 38. H3T3-P - fosforilação da treonina 3 da histona H3
- 39. H4 – histona 4
- 40. HAT – histona acetiltransferase
- 41. HDAC – histona desacetilase
- 42. HDAC 1 – histona desacetilase 1
- 43. HDAC 4 – histona desacetilase 4
- 44. *hdac1* – gene codificador da HDAC1
- 45. *hdac4* – gene codificador da HDAC4
- 46. HJ – hormônio juvenil
- 47. Id – abreviação arbitrária dos nomes dos genes
- 48. IMP – inosina monofosfato
- 49. KAT2A – histona desacetilase KAT2A
- 50. kDa - kilodalton
- 51. *Kr-h1* - Krüppel-homólogo 1
- 52. L1 – Larva 1
- 53. L2 – Larva 2
- 54. L3 – Larva 3
- 55. LC/MS – cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa
- 56. LD – Larva Defecante
- 57. LPD – Larva Pré-Defecante

58. LPD – larva pré-defecante
59. M – molar
60. m/z – massa/carga
61. mA – miliampère
62. MAT - metionina adenosiltransferase
63. MBD – *Methyl-CpG-binding domain* – domínios de ligação a dinucleotídeos CpG metilados
64. *mfe* – gene codificador da metil farnesoato epoxidase
65. MFE - metil farnesoato epoxidase
66. mg – miligrama
67. min – minutos
68. miRNA – microRNA
69. mL – mililitro
70. mM – milimolar
71. M-MLV - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
72. MRJP – *major royal jelly protein*
73. mRNA – RNA mensageiro
74. MS – 5-metiltetraidrofolato-homocisteína metiltransferase
75. MSTFA – Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
76. MTA – 5-metiltioadenosina
77. MTAP – 5-metiltioadenosina fosforilase
78. MTHFR –metilenotetraidrofolato redutase
79. N – número de indivíduos que compõem a amostra
80. n= número de cromossomos de células haploides
81. NaCl – cloreto de sódio
82. nM – nanômetro
83. °C – graus celsius
84. Oligo dT – uma pequena sequência de nucleotídeos desoxi-timina
85. P – probabilidade de significância
86. pb – pares de base
87. Pb – Pupa brown
88. Pbd – Pupa brown dark

- 89. PCA – análise de componente principal
- 90. PCR – *Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase
- 91. pH – potencial hidrogeniônico
- 92. pmol – picomolar
- 93. Pw – Pupa white
- 94. qPCR – PCR em Tempo Real Quantitativa
- 95. R2 – coeficiente de correlação
- 96. RNA – ácido ribonucleico
- 97. RNase – ribonuclease
- 98. RNasin – inibidor de RNase
- 99. ROX – carboxirodamina
- 100. RPL32 – proteína ribossomal-like 32
- 101. RT – transcrição reversa
- 102. s – segundo
- 103. SAH – S-adenosilhomocisteína
- 104. SAHH – S-adenosilhomocisteína hidrolase
- 105. SAM – S-adenosilmetionina
- 106. SHMT – serina hidroximetiltransferase
- 107. *sirt2* – histona desacetilase sirtuína 2
- 108. *Slope* – coeficiente angular da reta
- 109. TA – temperatura de anelamento
- 110. TBE – Tris/Borato/EDTA
- 111. THF – tetrahidrofolato
- 112. TRIS – tris(hidroximetil)aminometano
- 113. U – 1 unidade (1U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto
- 114. v/v – volume/volume
- 115. pmol – picomol

## RESUMO

Em rainhas e operárias de abelhas do gênero *Melipona* somente a alimentação diferencial não é suficiente para explicar o polifenismo das fêmeas. Nessas abelhas, além do componente ambiental (alimento), é necessário um componente genético. Esse mecanismo ainda não foi totalmente elucidado e pode ser que envolva eventos epigenéticos e regulação metabólica além dos mecanismos genéticos. Nesse contexto, esse trabalho analisou a expressão dos transcritos dos genes codificadores das enzimas desacetilases HDAC1 e HDAC4 e acetiltransferase KAT2A, o efeito do inibidor de histona desacetilase 10HDA na diferenciação de castas e, o perfil metabólico de larvas e do alimento larval de *Melipona scutellaris*. Os transcritos de *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* são expressos em todos os estágios, com flutuações nos estágios e castas, e podem estar relacionados à regulação endócrina. O 10HDA foi incapaz de promover a diferenciação em rainhas. Os metabólitos de larvas e alimento estão enriquecidos para metabolismo de galactose. O perfil metabólico de larvas pode ser indicador de casta/sexo e de alterações epigenéticas. Nossos resultados sugerem que regulação epigenética e metabólica atuem sinergicamente com mecanismos hormonais e genéticos para a diferenciação de castas em *Melipona*.

**Palavras-chave:** *Melipona*, diferenciação de castas, epigenética, modificação de histonas, metabolômica, alimento larval, GC/MS

## ABSTRACT

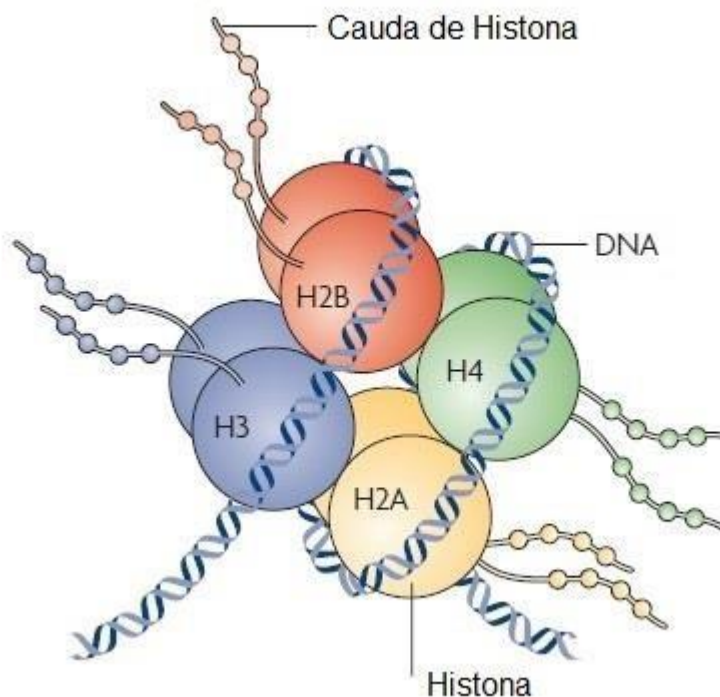
In bees from genus *Melipona* bees, differential feeding is not sufficient to explain female polyphenism. In these bees, in addition to the environmental component (food), a genetic component is required. This mechanism has not yet been fully elucidated and may involve epigenetic events and metabolic regulation in addition to genetic mechanisms. In this context, this work analyzed the expression of the transcripts of the genes coding for the enzymes deacetylases HDAC1 and HDAC4 and acetyltransferase KAT2A, the effect of histone deacetylase inhibitor 10HDA on caste differentiation and the metabolic profile of larvae and larval food of *Melipona scutellaris*. The *hdac1*, *hdac4* and *kat2a* transcripts are expressed at all stages, with fluctuations in stages and casts, and may be related to endocrine regulation. 10HDA was unable to promote differentiation in queens. Larvae and food metabolites are enriched for galactose metabolism. The metabolic profile of larvae may be an indicator of caste/sex and epigenetic modifications. Our results suggest that epigenetic and metabolic regulation act synergistically with hormonal and genetic mechanisms for drive caste differentiation in *Melipona*.

**Keywords:** *Melipone*, caste differentiation, epigenetics, histone modifications, metabolomics, larval food, GC/MS

## 1 INTRODUÇÃO

Em organismos multicelulares complexos, a diferenciação celular é um pré-requisito, uma vez que, embora a maioria das células contenha, essencialmente, o mesmo genoma, os tipos e funções celulares diferem. São as diferenças quantitativas e qualitativas na expressão dos genes que permitem que tecidos geneticamente iguais produzam fenótipos variáveis. Dessa maneira, é a modulação da expressão gênica que fundamenta os processos de diferenciação e desenvolvimento (GIBNEY; NOLAN, 2010; MENSAERT et al., 2013; HOLMAN; TRONTTI; HELANTERÄ, 2016).

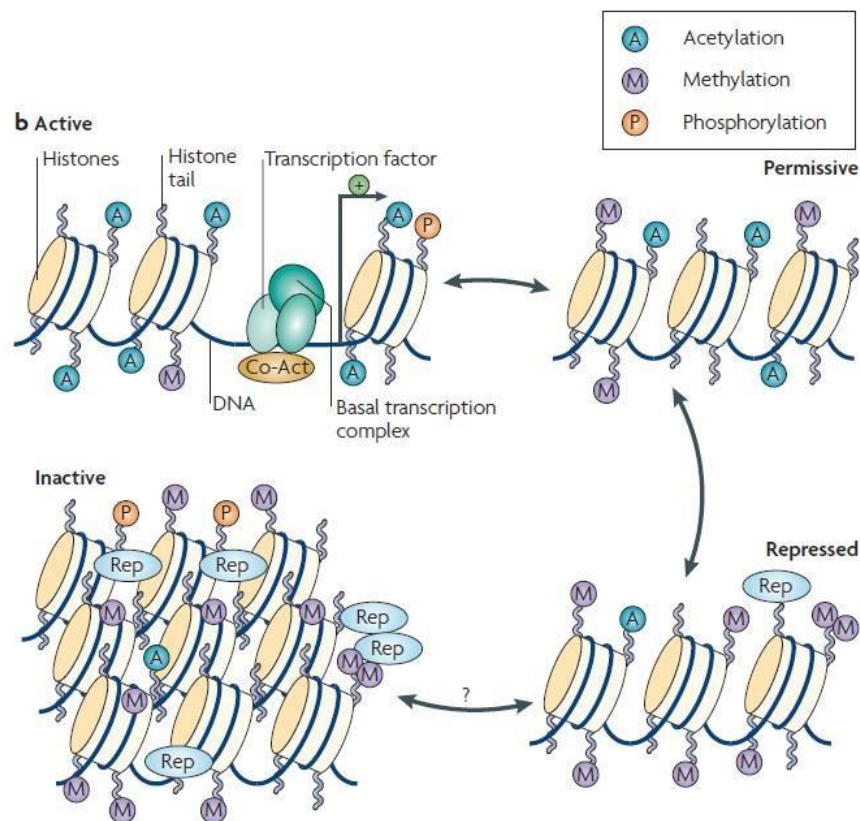
Nas células eucarióticas, o DNA é empacotado dentro do núcleo com histonas e outras proteínas que, coletivamente, formam a fibra de cromatina (CHODAPARAMBIL et al., 2006; GAN et al., 2007; ARISTIZABAL et al., 2019). O primeiro nível de compactação do DNA é alcançado pelo enovelamento de 147 pares de base (pb) do duplex de DNA em, aproximadamente, 1,7 voltas em torno de um octâmero de histonas, formando a unidade fundamental de repetição da cromatina, conhecida como nucleossomo. A ligação do DNA, carregado negativamente, às proteínas histonas é forte, uma vez que essas apresentam alto teor de aminoácidos básicos com cadeias laterais carregadas positivamente, como arginina e lisina. Os octâmeros de histonas, que são altamente conservados, consistem em um heterotetrâmero de histonas H3- H4 flanqueado por dois heterodímeros de histonas H2A-H2B. Cerca de 75% da massa do octâmero corresponde à estrutura globular das histonas na qual o DNA enovela-se e os 25% restantes formam longas caudas aminoterminal (Figura 1) (COSGROVE; WOLBERGER, 2005; DONG; BODE, 2006; ROBINSON et al., 2008; GIBNEY; NOLAN, 2010; SUGANUMA; WORKMAN, 2011; LOCHMANOV et al., 2019).



**Figura 1:** Representação esquemática de um nucleossomo, mostrando uma dupla fita de DNA enovelada em um octâmero de histonas, composto de duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As extremidades aminoterminal das histonas estão voltadas para fora do complexo do nucleossomo. Fonte: TSANKOVA et al., 2007.

No total, há oito caudas aminoterminal flexíveis que se estendem para fora do núcleo do nucleossomo e estão livres para fazer numerosos contatos intermoleculares. Essas caudas contêm sítios de ligação para proteínas reguladoras e também são substrato para várias enzimas que catalisam modificações pós-traducionais covalentes, incluindo acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e ADP-ribosilação de resíduos específicos (Figura 2) (SUGANUMA; WORKMAN, 2011; NICHOLSON; VELAND; CHEN, 2015; GALBRAITH; YI; GROZINGER, 2016).





**Figura 2:** Representação esquemática das extremidades aminoterminal de histonas modificadas por diferentes radicais e das implicações dessas modificações na formação dos dois principais estados estruturais da cromatina: eucromatina (parte superior esquerda) e heterocromatina (parte inferior esquerda). Fonte: TSANKOVA et al., 2007.

A organização do DNA em cromatina não é somente um meio de empacotamento do DNA para que ele possa caber dentro do espaço limitado do núcleo, mas também, mecanismo pelo qual a expressão gênica pode ser regulada (BARLOW et al., 2001; AUSIÓ, 2006). A fibra de cromatina é altamente dinâmica e complexa, apresentando alto grau de plasticidade físico-química. Ela pode adotar diversas conformações tridimensionais dependendo do contexto nuclear e de modificações bioquímicas tanto no DNA quanto nas histonas. Seus diferentes estados de compactação regulam o acesso da maquinaria celular ao DNA para realização de processos como, replicação, transcrição, reparo e recombinação (ARISTIZABAL et al., 2019; LOCHMANOV et al., 2019).

Os dois principais estados da cromatina são heterocromatina e eucromatina. Em um dos extremos, a cromatina adota uma estrutura altamente condensada, heterocromatina, na qual os promotores dos genes não são acessíveis e os genes ficam silenciados. No outro extremo, a eucromatina é menos condensada e acessível à maquinaria celular e contém a maioria dos genes ativamente transcritos (ou potencialmente ativos) (DEAN; SANTOS; REIK, 2003; ARNEY; FISHER, 2004; KOSAK; GROUDINE, 2004; COSGROVE; WOLBERGER, 2005; QUINA; BUSCHBECK; DI CROCE, 2006; GUIL; ESTELLER, 2009; LAW; JACOBSEN, 2010; KAROUTAS et al., 2019). Além das regiões estruturais do genoma que apresentam heterocromatina constitutiva, essencialmente encontrada nos centrômeros, outras regiões genômicas podem transitar entre uma conformação mais aberta, eucromatina e uma mais compacta, a heterocromatina facultativa (GUIL; ESTELLER, 2009).

Os mecanismos que levam à modificação da estrutura da cromatina e permitem que os padrões de expressão gênica sejam diferentes, de acordo com a linhagem celular e estágio do desenvolvimento, são chamados de mecanismos epigenéticos (BRANCO; FICZ; REIK, 2012; SMITH et al., 2012). Por definição, eles não provocam alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, mas geram padrões globais epigenéticos hereditários, conhecidos como epigenomas (SHARMA; KELLY; JONES, 2009; BAKULSKI et al., 2012; PATALANO et al., 2012; MENSAERT et al., 2013). Os mecanismos epigenéticos podem ser divididos em quatro categorias principais: metilação de nucleotídeos no DNA; modificações covalentes de histonas; mecanismos não covalentes, como incorporação de variantes de histonas e remodelamento de nucleossomos; e RNAs não codificantes, incluindo microRNAs (miRNAs) e RNAs não codificantes longos (lncRNAs) (MAJO; CALORE, 2018; NIEBORAK; SCHNEIDER, 2018; ARISTIZABAL et al., 2019; YE et al., 2019).

Há duas propostas para função dessas modificações da estrutura da cromatina. Uma delas é que o empacotamento é diretamente alterado, seja por uma mudança de carga eletrostática seja pelo contato entre nucleossomos, para abrir ou fechar o polímero de DNA, controlando, assim, o acesso da maquinaria de transcrição e de proteínas de ligação, como fatores de transcrição, ao DNA (GALBRAITH; YI; GROZINGER, 2016; ARISTIZABAL et

al., 2019; LOCHMANOV et al., 2019). A outra função é que as porções químicas modificadas alteram a superfície do nucleossomo para promover a associação de proteínas ligantes à cromatina. Vários estudos das últimas décadas apoiam a ideia de que essas modificações regulam a transcrição por meio do recrutamento de complexos proteicos efetores (BERGER, 2007; SUGANUMA; WORKMAN, 2011; LOCHMANOV et al., 2019).

São as modificações na estrutura da cromatina que permitem que o epigenoma encontre-se em equilíbrio dinâmico, sendo altamente responsivo a estímulos ambientais (químicos, nutricionais, físicos, etc.), fisiológicos ou relacionados ao desenvolvimento (SZYF, 2007; WEDD; KUCHARSKI; MALESZKA, 2016; LOCHMANOV et al., 2019). A plasticidade epigenética está envolvida na mediação de polifenismos induzidos ambientalmente. O polifenismo ocorre quando um mesmo genótipo produz diversos fenótipos e isso é relativamente comum no Reino Animal. É possível encontrar vários modelos de polifenismo na classe dos insetos, nos quais, frequentemente, larvas, pupas e indivíduos adultos diferem em várias características sem que haja alterações na sequência de nucleotídeos ao longo das fases do desenvolvimento (ERNST et al., 2015; HOLMAN; TRONTTI; HELANTERÄ, 2016; RICHARD et al., 2019). O polifenismo em insetos ocorre, de modo geral, pelos seguintes passos: 1) percepção inicial de estímulos ambientais; 2) transmissão neuroendócrina desses estímulos para os tecidos-alvo; 3) ativação de mecanismos epigenéticos que permitem a instalação de programas transcricionais alternativos responsáveis pelo estabelecimento de fenótipos distintos (RICHARD et al., 2019).

Além de estarem envolvidos em processos de metamorfose, estudos mostram que processos epigenéticos participam da diferenciação de castas em insetos sociais, onde organismos que compartilham um mesmo genoma contrastam em fenótipos morfológicos, reprodutivos e comportamentais (SUMNER; PEREBOOM; JORDAN, 2006; LYKO et al., 2010; BONASIO et al., 2012; PATALANO et al., 2012; BONASIO, 2014; YAN et al., 2015; MITAKA; TASAKI; NOZAKI, 2018; OPACHALOEMPAN et al., 2018; SHIELDS et al., 2018).

Nas espécies de formigas *Camponotus floridanus* e *Harpegnathos saltator* foi demonstrado que há maior expressão de desacetilases do tipo sirtuínas nas fêmeas reprodutivas de *Harpegnathos saltator*, expressão casta-específica de microRNAs, de histonas metiltransferases e regulação diferencial de genes relacionados com funções neurais e comunicação química (BONASIO et al., 2010). *Harpegnathos saltator* apresenta, também, padrões de expressão casta-específicos de lncRNAs no cérebro (SHIELDS et al., 2018). Em *Camponotus floridanus*, histonas desacetilases (HDACs) estão envolvidas na transição entre os comportamentos de forrageamento e guarda (SIMOLA et al., 2016) e as subcastas de operárias diferem em padrões de modificações de histonas em cerca de 18% do genoma (SIMOLA et al., 2013), sugerindo que estas modificações estão envolvidas na determinação de padrões de comportamento específicos de cada subcasta. Ainda nessa espécie, uma comparação de metilomas encontrou genes diferencialmente metilados em rainhas e operárias, especialmente genes relacionados à reprodução (BONASIO et al., 2012; BONASIO, 2014).

Em abelhas da espécie *Apis mellifera* foi demonstrado que aproximadamente 550 genes são diferencialmente metilados no cérebro de rainhas e operárias (LYKO et al., 2010; FORET; KUCHARSKI; PELLEGRINI, 2012). Foram identificados, também, metilação diferencial (HERB et al., 2012), expressão diferencial de microRNAs (BEHURA; WHITFIELD, 2010; GREENBERG et al., 2012) e expressão diferencial da histona desacetilase *sirt2* (ROBERTS; ELEKONICH, 2013), quando comparado o cérebro de nutridoras e forrageiras. Nessas abelhas, a interferência no processo de metilação em larvas, por meio do silenciamento da DNA metiltransferase 3 (DNMT 3), altera o padrão da heterocromatina, promove reprogramação epigenética e leva à produção de rainha, assim como faz a alimentação diferencial das larvas, indicando a metilação como um mecanismo epigenético de diferenciação de castas (KUCHARSKI et al., 2008; LI-BYARLAY et al., 2013). Na mesma espécie, foi identificado um inibidor de histona desacetilase na geleia real, ácido 10-hidróxi-2E-decenóico (10HDA), que é potencialmente importante na regulação de genes envolvidos na diferenciação em rainhas (SPANNHOFF et al., 2011; PATALANO et al., 2012).

Cardoso-Júnior et al. (2017a) demonstraram sistema de metilação/demetilação funcional e modificações pós-traducionais de histonas em *Melipona scutellaris*. Constataram que tanto os níveis de fosforilação da treonina 3 da histona H3 (H3T3-P) quanto os níveis de monometilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4-Me) são maiores em rainhas recém-emergidas do que em operárias na mesma faixa etária. Schumann et al. (2019), em análise de *corpora allata*, mostraram que a dispersão territorial da heterocromatina é um mecanismo epigenético importante na plasticidade fenotípica das castas de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*.

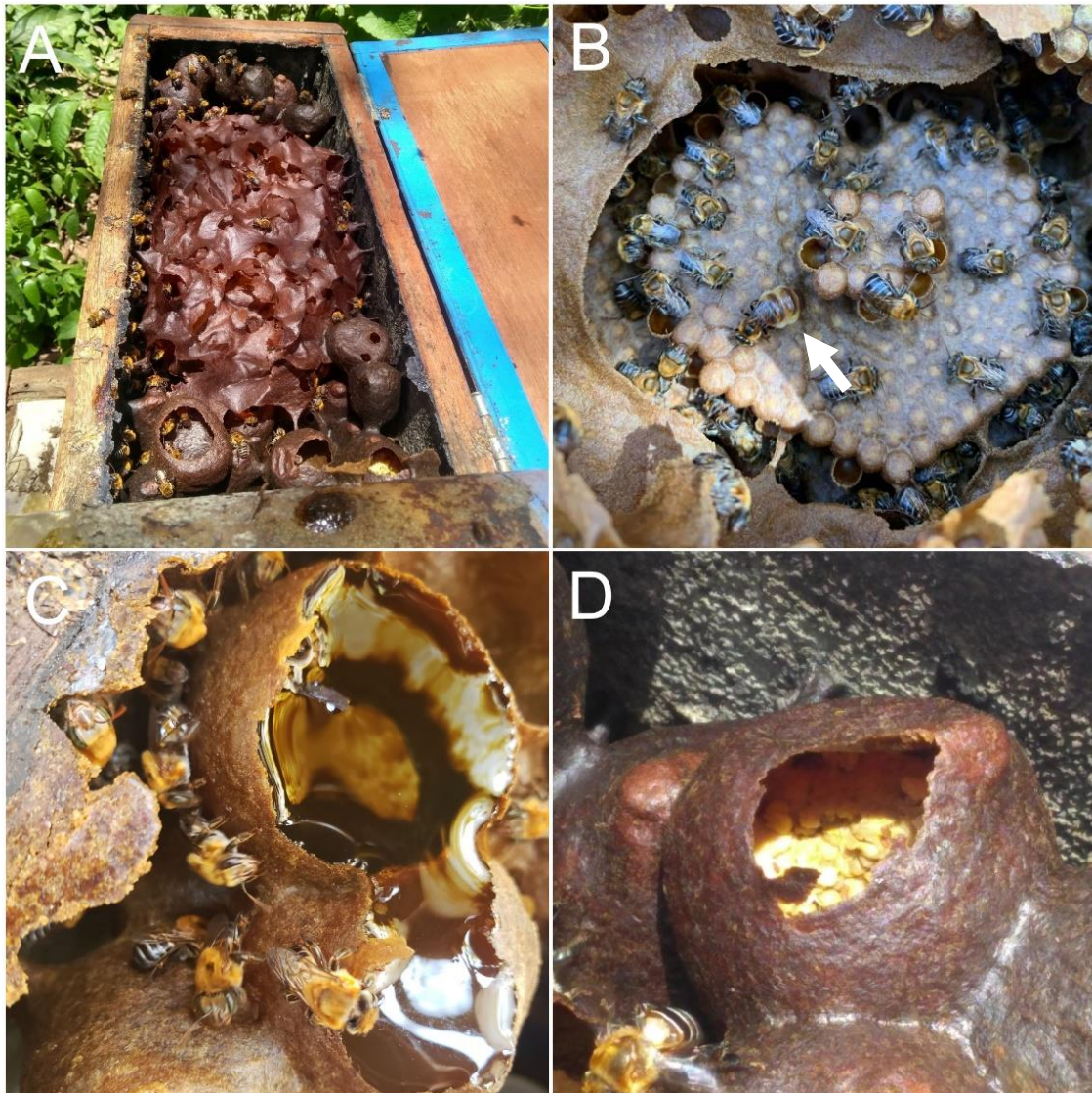
A literatura vem mostrando uma nova perspectiva do estudo da regulação epigenética no desenvolvimento e na diferenciação de castas em insetos sociais. Apesar de serem um excelente modelo para o estudo de características sociais e comportamentais, neurobiologia, desenvolvimento, ecotoxicologia e regulação da expressão gênica (SANTANA et al., 2006; DE MORAIS et al., 2018), as abelhas, com exceção de *Apis mellifera*, ainda são pouco exploradas quanto aos diferentes mecanismos que promovem a diferenciação das fêmeas, em castas.

As abelhas da tribo Meliponini são conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, uma vez que possuem ferrões atrofiados, sendo amplamente distribuídas nas regiões Neotropicais (MICHENER, 2007; LOLI, 2008). As abelhas sem ferrão possuem grande importância ecológica e econômica, uma vez que, dependendo do ecossistema, podem ser responsáveis por 30 a 90% da polinização de plantas nativas e cultivadas (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; HEARD, 1999; KERR et al., 2001), contribuindo para o sucesso reprodutivo, aumento da diversidade genética das espécies vegetais, aumento da produção e conservação de habitats (MICHENER, 2007; LOLI, 2008). Além disso, a maioria das espécies produz mel, cera e própolis (VELIKOVA et al., 2000) mostrando sua importância para economia e para a saúde. Do ponto de vista ecológico, o desaparecimento dos meliponídeos devido a ações antrópicas, como desmatamento e extrativismo, leva à extinção de espécies vegetais importantes, implicando em um ciclo de desequilíbrio ecológico (LOLI, 2008).

As abelhas *Melipona scutellaris* são insetos eussociais, popularmente conhecidas como “uruçu verdadeira”, “uruçu do nordeste” ou “uruçu do campo”. São endêmicas da região Nordeste do Brasil, distribuindo-se pelas zonas de transição entre a Mata Atlântica e a Caatinga nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (VIANA et al., 2013). Apresentam sistema de determinação de sexo hapodiploide, com machos haploides com  $n=9$  cromossomos (oriundos de ovos não fecundados) e fêmeas diploides com  $2n=18$  (oriundas de ovos fecundados) (ROCHA et al., 2002; SILVA et al., 2014). A *Melipona scutellaris* é uma das espécies mais cultivadas para produção de mel e própolis, sendo importante fonte de renda na agricultura familiar (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Estudos com essa espécie são fundamentais para sua manutenção (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; DE SOUSA et al., 2013; DORIGO et al., 2019) visto que suas populações diminuíram significativamente como consequência da atividade humana.

Nas colônias de *Melipona scutellaris*, os discos de cria são empilhados horizontalmente, separados por pilares de cera e se encontram na área central da colmeia. Essa área é recoberta com lamelas de cera que ajudam a manter a temperatura do local. Nas áreas periféricas, encontram-se potes de cera para estocagem do alimento (mel e pólen) (Figura 3) (SANTOS, 2013).





**Figura 3:** Colônia de *Melipona scutellaris*. A) Visão global da colmeia. B) Células de cria, operárias e rainha (indicada pela seta). C) Potes de mel. D) Pote de pólen.

As fêmeas de *Melipona scutellaris* dividem-se em duas castas: rainhas e operárias. As rainhas são fêmeas férteis, responsáveis pela reprodução e manutenção da coesão da colônia por meio de produção de feromônios. As rainhas virgens são menores que as operárias, com cabeça, olhos e tórax mais estreitos. O abdômen aumenta de volume após a fertilização. As operárias são fêmeas estéreis ou semi-estéreis, responsáveis pelas tarefas de manutenção da colônia (alimentação da cria e da rainha, coleta de alimento, limpeza, construção de alvéolos e demais parte do ninho, defesa) e, em alguns casos, pela postura de ovos que darão origem a machos (ovos reprodutivos) ou ovos que servirão de alimento à rainha (ovos tróficos). Os machos copulam com as

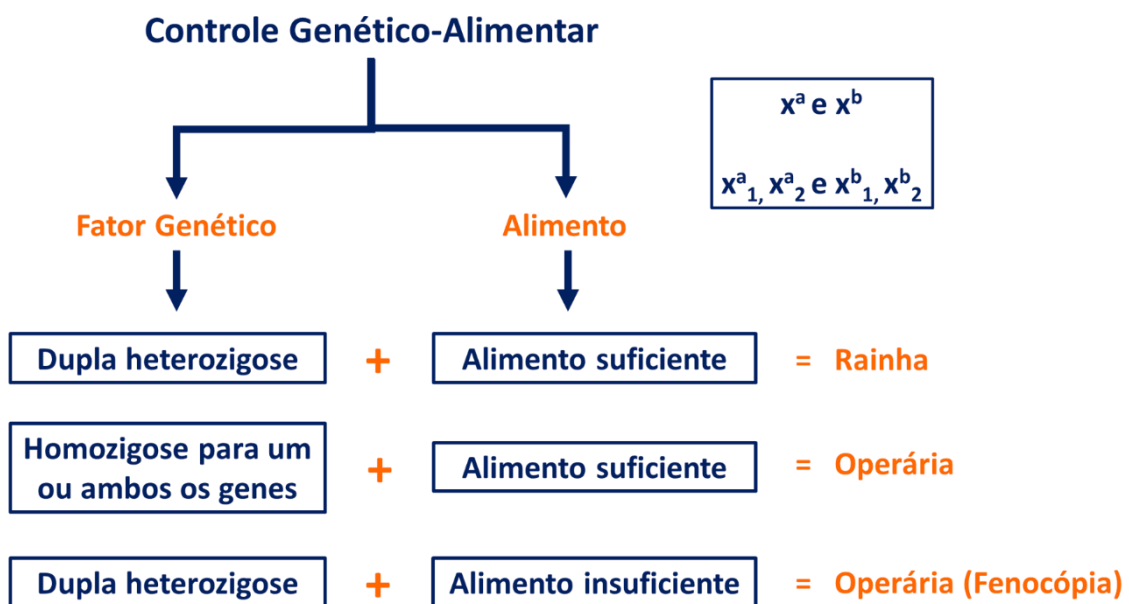
rainhas jovens e permanecem na colmeia apenas no primeiro terço de suas vidas. Eles já foram vistos desempenhando trabalhos como, aquecimento da cria, produção e manipulação de cera, desidratação e coleta de néctar e pólen nas flores (KERR, 1950; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; VELTHUIS; ROELING; IMPERATRIZ-FONSECA, 2001).

Para maior parte dos Hymenoptera, a diferenciação de castas é trófica, via alimentação diferencial da larva (KERR; NIELSEN, 1966). Em abelhas *Apis mellifera*, larvas destinadas a serem rainhas são alimentadas durante a vida larval com geleia real, enquanto operárias e machos são alimentados apenas por um curto período de seu desenvolvimento com geleia real (GABOR MIKLOS; MALESZKA, 2011). A geleia real consiste em secreção leitosa derivada das glândulas hipofaríngeas e mandibulares de nutridoras. É composta por proteínas, carboidratos, lipídeos, aminoácidos livres, minerais, vitaminas e substâncias bioativas, como peptídeos antimicrobianos (LERCKER et al., 1981; SHI et al., 2012). Diversos estudos têm identificado compostos na geleia real que seriam responsáveis pela diferenciação de larvas de abelhas em rainhas. Os resultados são controversos. Entre os possíveis candidatos estão o monômero da proteína MRJP1 (*royalactin*) (KAMAKURA, 2011) e o ácido graxo 10HDA (SPANNHOFF et al., 2011).

A alimentação diferencial das castas é regra, também, para a maioria das abelhas da tribo Meliponini (CAMPOS, 1979; HARTFELDER; ENGELS, 1989). Exceção a essa regra são as abelhas do gênero *Melipona*, para as quais é proposto o mecanismo genético-alimentar (KERR, 1950). Em *Melipona*, o aprovisionamento de alimento nas células de cria é massal. As células de cria são preenchidas com o alimento larval regurgitado pelas operárias nutridoras, logo após a célula ser construída e imediatamente antes da oviposição pela rainha. Após a oviposição, a célula é imediatamente fechada e aberta apenas para a eclosão do imago, eliminando a possibilidade de qualquer mudança no alimento larval após esse processo. Assim, rainhas, operárias e machos se desenvolvem em células de cria indiferenciadas, ou seja, com o mesmo tamanho e mesma quantidade e qualidade de alimento (KERR, 1950; KERR; STORT; MONTENERGRO, 1966; KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; VAN VEEN, JOHAN, 2000).



O modelo de controle genético-alimentar para diferenciação de castas em *Melipona* foi proposto por Kerr, em 1948, para explicar o fato de que entre larvas igualmente alimentadas, até 25% do total de fêmeas se desenvolvem em rainhas. Segundo esse mecanismo, as divergências morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre rainhas e operárias seriam determinadas pela presença de dois genes,  $x^a$  e  $x^b$ , com dois alelos cada um,  $x^{a_1}$  e  $x^{a_2}$  e  $x^{b_1}$  e  $x^{b_2}$ . A dupla heterozigose ( $x^{a_1}/x^{a_2}$  e  $x^{b_1}/x^{b_2}$ ) resultaria na diferenciação de larva em rainha, desde que a quantidade de alimento ingerida pela larva seja suficiente (KERR, 1948, 1950; KERR; NIELSEN, 1966; CABRAL, 2009). A homozigose para um ou ambos os genes levaria ao desenvolvimento de operária, independentemente da quantidade de alimento recebida. A situação de dupla heterozigose com aporte de alimento insuficiente seria responsável pela produção de fenocópias, fêmeas com fenótipos de operárias e características morfológicas internas de rainha (CRUZ-LANDIM; HOFLING; FONSECA, 1980) conforme mostrado na Figura 4.



**Figura 4:** Controle genético-alimentar para determinação de castas em *Melipona*, proposto por Kerr em 1948 e modificado por Silva (2011).

O hormônio juvenil (HJ), um hormônio sesquiterpenóide acíclico, é o principal hormônio que regula a diferenciação de casta e o polietismo etário em

abelhas. A aplicação tópica de hormônio juvenil em larvas no 3º instar (L3-3 e LPD) de *Melipona* promove a diferenciação em rainhas (CAMPOS; VELTHUIS-KLUPPELL; VELTHUIS, 1975; CAMPOS, 1978; BONETTI, 1983; BONETTI, 1984; BONETTI; CRUZ-LANDIM; KERR, 1994; BONETTI; KERR; MATUSITA, 1995). As rainhas induzidas com hormônio juvenil são equivalentes às naturais em morfologia externa, morfologia e peso dos ovários, volume da spermateca e presença de vitelogenina na hemolinfa (BONETTI, 1984; BONETTI; CRUZ-LANDIM; KERR, 1994). O hormônio juvenil é essencial para ativação de cascatas gênicas que regulam o processo de diferenciação de castas (BONETTI; KERR, 1985; BONETTI; CRUZ-LANDIM; KERR, 1994; HARTFELDER; ENGELS, 1998; BARCHUK, 2007).

Jarau et al. (2010) descreveram que outro fator chave para diferenciação de castas em *Melipona* é a adição ao alimento larval de geraniol, um componente da secreção da glândula labial de nutridoras. Segundo esses autores, a adição do geraniol é capaz de promover a diferenciação em rainhas, nas larvas com predisposição genética, atingindo a porcentagem de 25% de rainhas previstas pela Hipótese KERR. De Carvalho et al. (2017) encontraram indícios de função olfatória em larvas de *Melipona scutellaris*, indicando que estímulos ambientais, como geraniol ou outros componentes do alimento larval, poderiam ser percebidos por esse sistema olfatório, desencadeando respostas celulares envolvidas na diferenciação de castas nessas abelhas.

Marcadores morfológicos (CRUZ-LANDIM; HOFLING; FONSECA, 1980; BONETTI; CRUZ-LANDIM; KERR, 1994) e moleculares (BONETTI; KERR; MATUSITA, 1995; WALDSCHMIDT; DE BARROS; CAMPOS, 2000; MAKERT; PAXTON; HARTFELDER, 2006; SANTANA et al., 2006; UEIRA-VIEIRA et al., 2008; BRITO et al., 2015) acrescentaram evidências à hipótese KERR, porém, não tem sido suficientes para explicar a diferenciação de castas em abelhas do gênero *Melipona*.

Tendo em vista os estudos com outros insetos sociais, inclusive em Hymenoptera (GLASTAD; HUNT; GOODISMAN, 2019) e o fato de fatores genéticos e ambientais (alimento) estarem envolvidos no mecanismo de diferenciação de castas em *Melipona*, faz dessa abelha um organismo

promissor para buscar nas análises epigenéticas uma explicação para a produção dos fenótipos divergentes nas castas.

Uma das modificações pós-traducionais de histonas bem estudadas compreende a acetilação de resíduos de lisina, que promove o aumento da expressão gênica. A acetilação neutraliza a carga positiva das cadeias laterais desses resíduos e, assim, enfraquece a interação eletrostática da histona com a molécula de DNA, relaxa a estrutura da cromatina e facilita o acesso de proteínas regulatórias aos promotores dos genes (VERDIN; OTT, 2015; ALI et al., 2018; BARNES; ENGLISH; COWLEY, 2019). As caudas de histonas desacetiladas são altamente carregadas e limitam o acesso da maquinaria de transcrição aos promotores gênicos, via condensação da cromatina. Dessa forma, geralmente, a acetilação de histonas marca regiões transcricionalmente competentes e ativas, enquanto histonas hipoacetiladas são encontradas em regiões de heterocromatina ou de eucromatina transcricionalmente inativas (EGGER et al., 2004; DUEÑAS-GONZÁLEZ et al., 2005; VERDIN; OTT, 2015; ALI et al., 2018; WANG et al., 2019).

A acetilação de histonas é controlada pelo balanço das atividades de duas famílias de enzimas: as histonas-acetiltransferases (HATs) e as histonas-desacetilases (HDACs) (ASFAHA et al., 2019; LOCHMANOV et al., 2019; YE et al., 2019).

As HDACs são fundamentais na remodelagem cromatínica por meio da retirada de grupos acetil dos resíduos de lisina das histonas (MORINE et al., 2012). As HDACs podem silenciar os genes de duas maneiras: 1. DNA metiltransferases (DnMTs) recrutam proteínas ligadoras de sítios CpG metilados (MBDs) com consequente recrutamento de HDACs, o que leva à condensação da cromatina, impedindo o acesso da RNA polimerase e dos fatores de transcrição aos genes alvo (LORINCZ; SCHUBELER; GROUDINE, 2001; BURGERS; FUKS; KOUZARIDES, 2002); 2. ação direta de uma metilase de DNA e desacetilase de histona que resulta na diminuição dos níveis de transcrição (FUKS et al., 2000).

A família de HDACs humanas consiste em um total de 18 enzimas divididas em quatro grupos: classe I, que inclui HDAC 1, 2, 3 e 8 (localizadas no núcleo); classe II, que inclui HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10 (localizadas tanto no núcleo como

no citoplasma); classe III, constituída por sirtuínas (1-7) e classe IV, que inclui HDAC 11 e apresenta características tanto da classe I quanto da classe II. Até o momento foram identificadas 17 enzimas acetiltransferases em humanos, que são divididas em cinco famílias baseadas no grau de similaridade de sequencias (PRUITT; HYPOMETHYLATION, 2016).

Análises epigenéticas, como as iniciadas por Cardoso-Júnior et al. (2017a) e por Schumann et al. (2019) em *Melipona scutellaris*, e análises sobre a composição do alimento larval surgem como forma de responder perguntas sobre fenótipos divergentes nas fêmeas dessas abelhas, ainda não totalmente explicados pela genética.

Nesse trabalho buscamos identificar e quantificar a expressão dos genes codificadores das enzimas desacetilases HDAC 1 e HDAC 4 e da enzima acetiltransferase KAT2A ao longo do desenvolvimento de fêmeas de *Melipona scutellaris*. Avaliamos ainda o efeito do ácido 10-hidróxi-2E-decenóico (10HDA) na diferenciação de castas e o perfil metabólico de larvas e do alimento larval de *Melipona scutellaris*. Investigamos, dessa forma, a influência da regulação epigenética e metabólica na produção de diferentes fenótipos nas fêmeas/castas de abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar diferenciação de castas, rainha e operária, em fêmeas de abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, sob o ponto de vista epigenético e metabólico.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar, por PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR), os níveis de transcritos dos genes codificadores de Histona Desacetilase 1 (HDAC 1), Histona Desacetilase 4 (HDAC 4) e Histona K(lisina) Acetiltransferase 2A (KAT2A) em *Melipona scutellaris*, em diferentes fases do desenvolvimento larval e em operária e rainha nas fases de pupa e de adulto recém emergido.

- Verificar o efeito do tratamento tópico de larvas de 3º instar com Ácido 10-hidróxi-2E-decenóico (10HDA) na diferenciação de castas em *Melipona scutellaris*.

- Identificar, por cromatografia gasosa de alta performance acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), os metabólitos (metabolômica) presentes em diferentes fases larvais e no alimento larval de *Melipona scutellaris*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética, no Laboratório de Nanobiotecnologia e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia/UFU e no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular/Incor-USP.

#### 3.1 Material Biológico

Nos experimentos foram analisados alimento larval, larvas, rainhas e operárias de *Melipona scutellaris* mantidas no Meliponário UFU (S 180 55' / W 450 17') do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. O material biológico foi coletado de colônias saudáveis e fortes (produzindo operárias, rainhas e machos). Para análise de metabólitos e compostos voláteis, as amostras foram coletadas no mesmo dia e em uma única colônia.

O transporte das células de cria do Meliponário até o Laboratório de Genética foi feito em placas de Petri, acondicionadas em caixas de isopor contendo algodão umidificado com água destilada. Durante a manipulação das células de cria, a umidade da Sala de Experimentos foi mantida acima de 75%, para evitar que as larvas ou o alimento larval desidratassem. Para isso, foram utilizados dois recipientes de água borbulhando (água + ebulidor) e um umidificador de ar comercial, de acordo com o descrito por Dorigo et al. (2019).

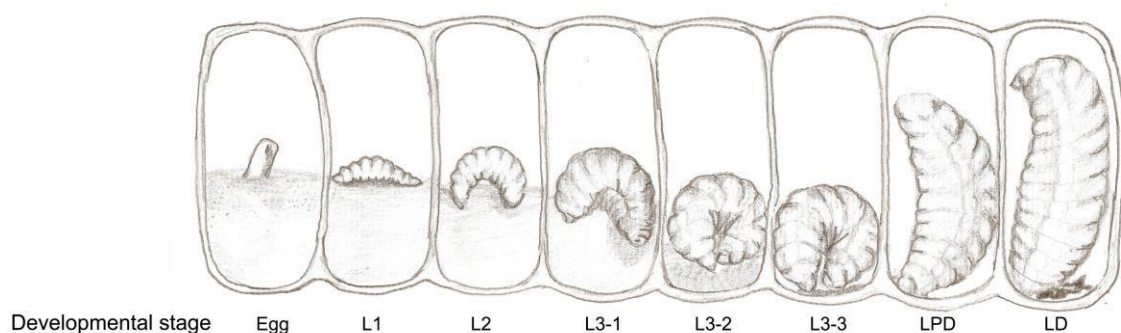
As fases de desenvolvimento das abelhas *Melipona scutellaris* e caracterização são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características das fases de desenvolvimento das abelhas *Melipona scutellaris*.

Sigla	Fase do Desenvolvimento	Estágios	Características
L1	Larva 1 (1° instar)		
L2	Larva 2 (2° instar)		

		L3-1	Alimento semilíquido na célula de cria, larvas com o corpo curvado e cor perolada
L3	Larva 3 (3° instar)	L3-2	Alimento pastoso na célula de cria, larvas com o corpo curvado e cor perolada
		L3-3	Alimento sólido na célula de cria, larvas com cor perolada brilhante
LPD	Larva Pré-Defecante (3° instar)	LPD	Ausência de alimento e de fezes na célula de cria, larvas em forma de vírgula e cor perolada brilhante
LD	Larva Defecante (3° instar)	LD	Ausência de alimento e presença de fezes na célula de cria, larvas com cor esbranquiçada eretas e cabeça voltada para cima
Pw	Pupa white		Pupa com corpo branco e olho branco
Pp	Pupa pink		Pupa com corpo branco e olho rosa
Pb	Pupa brown		Pupa com corpo branco e olho marrom
Pbl	Pupa brown light		Pupa levemente pigmentada e com olho marrom
Pbd	Pupa brown dark		Pupa com pigmentação escura e com olho marrom

Os estágios larvais, referidos na Tabela 1, foram identificados segundo Rossini (1989) e Dias, Bonetti e Kerr (2001) e os de pupa, segundo Dallacqua, Simões, Bitondi (2007) de acordo com a cor do corpo e pigmentação do olho. O desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de *Melipona scutellaris* estão representados na Figura 5.



**Figura 5:** Esquema representando o desenvolvimento larval e os cinco estágios do 3º instar larval de *Melipona scutellaris*. Fonte: Amaral et al. (2010).

## 3.2 Tratamentos

### 3.2.1 Tratamento de larvas de *Melipona scutellaris* com Hormônio Juvenil III

Células de cria foram desoperculados e larvas de *Melipona scutellaris* do 3º instar nos estágios L3-3 ou LPD (Larva Pré-Defecante) foram retiradas, com auxílio de pinça de ponta romba.

As larvas do grupo Experimento foram colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e tratadas topicamente com dose única de 1 µg de Hormônio Juvenil III (Juvenile Hormone III, Sigma-Aldrich, CAS Number 24198-95-6) dissolvido em 1 µL de Acetona P.A. (Dinâmica) de acordo com Bonetti, Kerr e



Matusita (1995). A aplicação tópica foi feita com microseringa Hamilton. A solução de uso de Hormônio Juvenil foi mantida, em gelo, em vial de vidro âmbar.

Os grupos Controle foram constituídos por larvas tratadas com 1 µL de Acetona P.A. (veículo) e por larvas que não receberam tratamento. As larvas dos grupos Experimento e Controle foram manipuladas do mesmo modo.

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 NaCl (DORIGO et al., 2019). Durante todo o período do experimento, as condições de temperatura e umidade relativa foram controladas com um termohigrômetro (Highmed).

Os indivíduos foram avaliados ao atingirem a fase de pupa de olho branco e corpo branco (Pw). O fenótipo de operária ou rainha natural foi identificado por meio de características morfológicas já definidas em trabalhos anteriores (CAMPOS, 1978; BONETTI, 1982).

### **3.2.2 Tratamento de larvas de *Melipona scutellaris* com Ácido 10-hidróxi-2E-decenóico**

Favos de cria foram desoperculados e larvas de *Melipona scutellaris* do 3º instar nos estágios L3-3 ou LPD (Larva Pré-Defecante) foram retiradas, com auxílio de pinça de ponta romba.

As larvas do grupo Experimento foram colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e tratadas topicamente com dose única de Ácido 10-hidróxi-2E-decenóico (10-HDA, Cayaman Chemicals, CAS Number 14113-05-4) diluído em Etanol P.A. (Dinâmica). Foi aplicado 1 µL de 10HDA nas concentrações de: 1,88 mM; 5 mM; 15 mM; 30 mM e 107 mM. As aplicações tópicas foram feitas com microseringa Hamilton e as soluções de uso de 10HDA foram mantidas em gelo, em vials de vidro âmbar.

Os grupos Controle foram constituídos por larvas tratadas com 1 µL de Etanol P.A. (veículo) e por larvas que não receberam tratamento. As larvas dos grupos Experimento e Controle foram manipuladas do mesmo modo.

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 NaCl (DORIGO et al.,

2019). Durante todo o período do experimento, as condições de temperatura e umidade relativa foram controladas com um termohigrômetro (Highmed).

Os indivíduos foram avaliados ao atingirem a fase de pupa de olho branco e corpo branco (Pw). O fenótipo de operária ou rainha natural foi identificado por meio de características morfológicas já definidas em trabalhos anteriores (CAMPOS, 1978; BONETTI, 1982).

### **3.3 Análise da Expressão Gênica**

#### **3.3.1 Extração de RNA total**

A extração de RNA total foi feita pelo método do TRIZOL (solução comercial de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento de RNA total, Ambion – Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. As abelhas foram maceradas em Trizol (1 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido) e o tecido foi agitado em vortex e incubado à 30°C por 5 min. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de Trizol, agitando-se por 15 s e incubando-se à 30°C por 2 min, seguido por centrifugação a 12000 g à 4°C por 15 min. A fase aquosa foi transferida para microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para cada mL e incubado à -20°C por 2 h. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 g à 4°C por 10 min. O pellet foi lavado com etanol 75% gelado e centrifugado a 7500 g à 4°C por 5 min. Repetiu-se a etapa de lavagem do pellet. Depois de seco a temperatura ambiente, o RNA extraído foi ressuscendido em água ultrapura tratada com DEPC 0,1% e autoclavada. O RNA foi tratado com 10 U de DNase I RNase free (Promega) 10X diluída (10 U para cada 10 µg de RNA). Foram adicionados à reação 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen). A reação foi incubada à 37°C por 30 min, seguido de aquecimento a 65°C por 10 min para inativação da enzima. O RNA foi quantificado em Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) a 260 nm.

### 3.3.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA (RT) foi utilizada a enzima M-MLV transcriptase reverse (Promega) e Oligo dT (15) (Invitrogen), seguindo instruções dos fabricantes. Na reação de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA total tratado, 10 pmol de Oligo dT (15) e 10 mM de dNTP. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos para desnaturar a estrutura secundária do molde e, em seguida, colocada em gelo. Acrescentados 2 µL de tampão M-MLV 10X, 0,1 M de DTT, 200 unidades de M-MLV transcriptase reverse, completando-se o volume para 20 µL com água ultrapura livre de nucleases. A reação foi incubada à 37°C por 50 minutos, seguido de aquecimento a 70°C por 15 minutos para inativação da enzima.

Apenas a primeira fita do cDNA foi sintetizada por transcrição reversa. A segunda fita foi sintetizada por PCR com o uso de primers específicos para os genes alvo. Como controle, foi utilizada amostra sem a enzima. A qualidade do cDNA foi testada, a partir do gene codificador da proteína ribossomal-like 32, *rpl32* (GenBank *accession number* AF441189) que além de um fragmento de 150 pb, amplifica um de 240 pb no caso de contaminação genômica.

### 3.3.3 Análise por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A quantificação da expressão gênica foi realizada por PCR em Tempo Real (RT-qPCR), na qual ocorre a quantificação dos níveis de fluorescência do DNA amplificado a cada ciclo.

Os *primers* utilizados (Tabela 2) foram desenhados utilizando o programa Oligo Explorer (Version 1.2). Foi feito um alinhamento local entre as sequências dos genes preditos de *Apis mellifera*, depositadas em banco de dados do NCBI, com o genoma de *Melipona quadrifasciata*, depositado no The Hymenoptera Genome Database (Beebase). Os *primers* foram desenhados com base nas sequências encontradas por homologia no genoma de *Melipona quadrifasciata*, uma vez que esse organismo apresenta maior homologia com as abelhas *Melipona scutellaris*. Como gene de controle endógeno foi utilizado o gene codificador da proteína ribossomal-like 32 (*rpl32*) (FREITAS et al., 2019).

**Tabela 2:** Sequências dos *primers* dos genes avaliados.

Gene ID	Primers	Fragmento (pb)	TA (°C)	Eficiência (%)
<i>hdac1</i>	F: GGTCTGTAGCTGCTGCTGTGA R: GCATGATGTAAACCACCACCCT	80	60	97,76%
<i>hdac4</i>	F: AAGAATGCGTTCGGGCTTG R: CGCGTTTTGGCAAGGTATCC	83	60	110,24%
<i>kat2a</i>	F: TTACGAAGGGGCAACACTGA R: CTTCCGTATGACAGCCGTA	79	60	105,84%
<i>rpl32</i>	F: GCTGGAGAATGGATACCAACACA R: CGTCCCCAAACACTTTCCAA	150	60	93,00%

Gene Id: Abreviação arbitrária dos nomes dos genes. pb: Tamanho dos fragmentos produzidos pelos *primers*, em pares de base. TA (°C): Temperatura de anelamento, em graus Celsius.

As reações de qPCR foram realizadas simultaneamente para os genes alvo e o gene normalizador (*rpl32*) em placas de leitura óptica de 96-well, com  $n \geq 5$  por grupo e triplicata técnica. Foram utilizados 1X QuantiNova SYBR® Green PCR Kit (Qiagen), 2,5 pmol de cada *primer*, 1 µL QN ROX Reference Dye, 1 µL de cDNA, completando-se com água ultra pura (MilliQ – DirectQ Millipore) autoclavada para um volume final de 10 µL. Todas as reações foram normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes de variações de volume e evaporação ao longo da reação.

As reações de PCR foram processadas em 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

O CT (*Cycle threshold*) foi definido de acordo com o primeiro ciclo no qual ocorre um aumento significativo na magnitude do sinal gerado, detectado na reação de PCR. Os valores de CT foram calculados pelo 7300 System Software (Applied Biosystems) e usados para calcular a expressão do mRNA do gene de interesse relativo ao mRNA do gene normalizador (*rpl32*). Os valores de CT foram transformados em valores de quantificação de acordo com o método de Livak e Schmittgen (2001) que é determinado pela resolução da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde CT = *cycle threshold*;  $\Delta CT$  = CT do gene alvo – CT do gene endógeno (*rpl32*);

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$  da amostra -  $\Delta CT$  da amostra normalizadora. Neste estudo foi utilizado como amostra calibradora um *pool* de amostras no estágio larval L2, que é o primeiro estágio de desenvolvimento avaliado nesse estudo.

Para padronização e análise de eficiência dos *primers* foram feitas reações com diluições seriadas de cDNA: sem diluição; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 (v/v) e construção de curvas padrão para cada par de *primers*. A curva padrão corresponde à regressão linear entre o logaritmo na base 10 da concentração inicial de ácido nucleico e o valor de CT. A eficiência da reação foi avaliada pelo valor slope (coeficiente angular da reta), dado pela curva, aplicado à fórmula  $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$ . Slope de -3,3 indica 100% de eficiência da amplificação do ensaio, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de CT das amostras (linearidade), onde o valor 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os valores individuais de CT. Foram considerados para este estudo valores de eficiência próximos de 100%, de slopes próximos de -3,3 e de  $R^2$  próximos de 1.

A especificidade dos produtos de RT-qPCR foi verificada por meio da análise da curva de dissociação de todos os genes. Os produtos da RT-qPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em Tampão TBE 1X (TRIS Base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) corado com Brometo de Etídeo (0,5 mg/mL) e visualizado em Foto Documentador (ImageQuant 150, GE). Para acompanhar a migração dos fragmentos amplificados foram utilizados marcadores de peso molecular de 50 pb e de 100 pb (Ludwig Biotec).

### 3.4 Metabolômica

Para identificar e quantificar os metabólitos presentes nas fases larvais e no alimento larval de *Melipona scutellaris*, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa de alta performance acoplada à espectrometria de massa (GC/MS).

### **3.4.1 Preparação das Amostras**

A análise metabolômica de larvas foi realizada com larvas do segundo (L2) e do terceiro instar larval (L3-3 e LD) em triplicata amostral e técnica. Para a metabolômica do alimento larval, células de cria contendo ovos foram desoperculadas, os ovos retirados e o alimento de cada célula foi individualmente transferido para um microtubo de 1,5 mL. A análise do alimento foi realizada em quintuplicata amostral e triplicata técnica.

O preparo das amostras consistiu na adição de 5 µL de padrão interno ácido mirístico D27 (3 mg/mL) a cada amostra e, a seguir, as amostras foram secas em SpeedVac Vacuum (Thermo Fisher Scientific) por 18 horas. Para derivatização, os metabólitos secos foram solubilizados em 20 µL de metoxilamina (40 mg / mL em piridina), enriquecidos com 3µL de FAME (éster metílico de ácido graxo) e incubados por 16 horas a 25°C e agitação de 650 rpm. Em seguida, foram adicionados 90 µL de MSTFA (N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida) com 1% de TMCS (Trimetilclorossilano). As amostras foram incubadas durante 1 hora a 25°C, seguido de centrifugação a 15.800 g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a derivatização, os sobrenadantes foram transferidos para vials de vidro.

### **3.4.2 Cromatografia Gasosa de Alta Performance Acoplada à Espectrometria de Massa**

Foi injetado aleatoriamente 1 µL de cada amostra derivatizada em um sistema Agilent 7890B GC operado no modo splitless. Uma coluna capilar DB5-MS + 10m Duraguard (Agilent # 122-5532G) com fluxo de gás hélio de 0,82 mL/min, foi aplicada para a separação dos metabólitos. A temperatura do injetor foi fixada em 250°C. A temperatura da coluna foi mantida a 60°C durante 1 min e depois aumentada para 310°C a uma taxa de 10 °C/min durante 37 minutos. O efluente da coluna foi introduzido na fonte de íons de um detector seletivo de massa Agilent 5977A. O detector operou no modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV) e os espectros de massa foram registrados após um atraso de solvente de 6,5 min com 2,9 varreduras por segundo, começando na massa 50 e terminando na

massa 550, com tamanho de etapa de 0,1 m/z. A temperatura do quadrupolo de MS foi fixada em 180°C e a temperatura da fonte de íons foi fixada em 280°C. Os dados foram deconvoluídos com janela de tamanho de RT de 75 e 100, limite de SNR de 1, janela de extração delta m / z de 0,3 AMU à esquerda e 0,7 à direita. A identificação provisória dos compostos foi feita comparando o espectro de massa e o tempo de retenção (RT) de todos os compostos detectados com a biblioteca Agilent Fiehn GC / MS Metabolomics RTL (versão A.02.02). Os metabólitos que não foram identificados na biblioteca Agilent Fiehn GC / MS Metabolomics RTL foram pesquisados na biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST) 11 (2014) usando Desconhecidos - Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis (Versão B.06.00).

### **3.5 Análises Estatísticas**

Para as análises estatísticas de expressão gênica foi usado o programa estatístico GraphPad Prism (Version 8.00) e para as análises de metabolômica, o software *Metaboanalyst* (Version 4.00). Como os dados apresentaram distribuição assimétrica foi feito o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A hipótese de igualdade foi rejeitada para  $P \leq 0.05$ . Para comparação entre castas foi feito 2Way-ANOVA seguida pelo teste *Sidak's multiple comparisons test*.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da Expressão dos Genes Codificadores de Histonas Desacetilases e Histona Acetiltransferase em *Melipona scutellaris*

A regulação da expressão gênica é baseada na diferenciação celular e no 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 ativa transcrição.

Se a acetilação/desacetilação de histonas está associada ao remodelamento da cromatina, não é surpreendente se um mecanismo complexo, que envolve várias cascatas gênicas, como é o caso da diferenciação de castas, apresentar silenciamento gênico epigenético, que resulte em expressão gênica casta-específica.

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

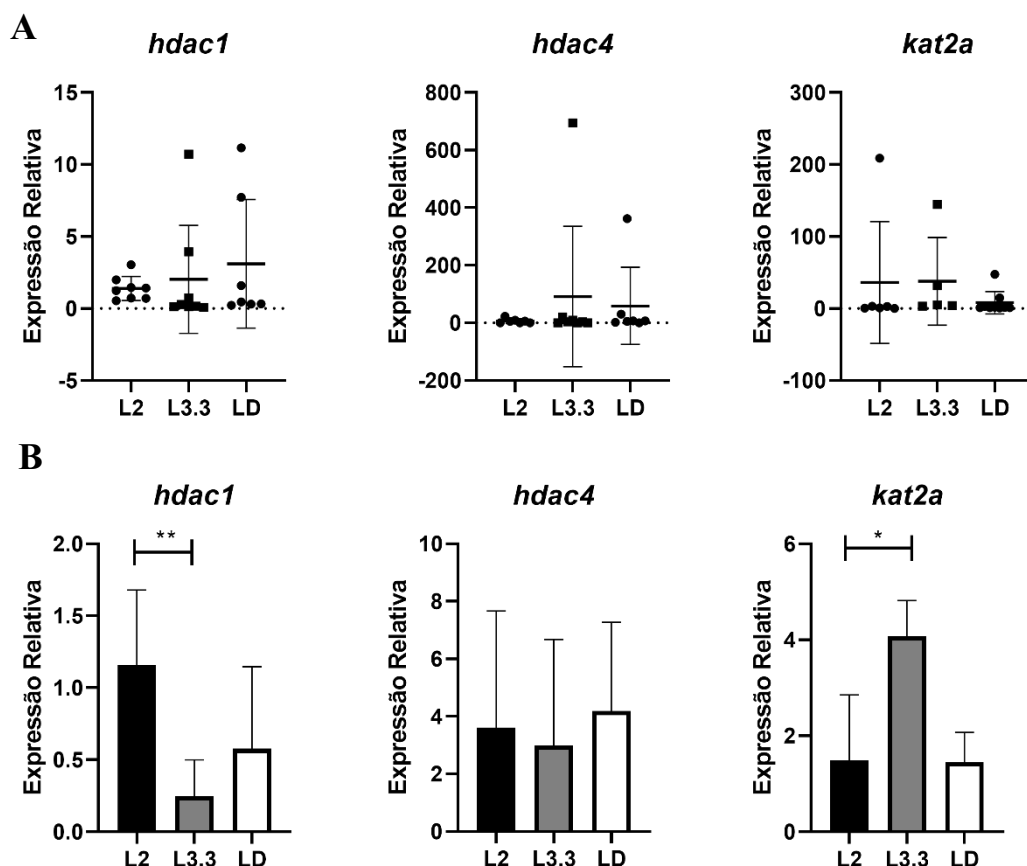
Nessa investigação foi possível identificar e quantificar transcritos relacionados à maquinaria de acetilação e desacetilação de histonas em *Melipona scutellaris*. Verificou-se a expressão de transcritos de *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em todos os estágios analisados e as flutuações do nível de expressão desses transcritos nas fases de desenvolvimento e castas reforçam a hipótese da regulação sutil do processo de diferenciação de castas.

#### 4.1.1 Níveis de Transcritos dos Genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em Larvas de *Melipona scutellaris*

Para todos os genes analisados, uma amostra em L2, duas amostras em L3-3 e duas amostras em LD apresentaram níveis de expressão relativa muito destoantes das outras amostras em mesma fase do desenvolvimento (Figura 6A).



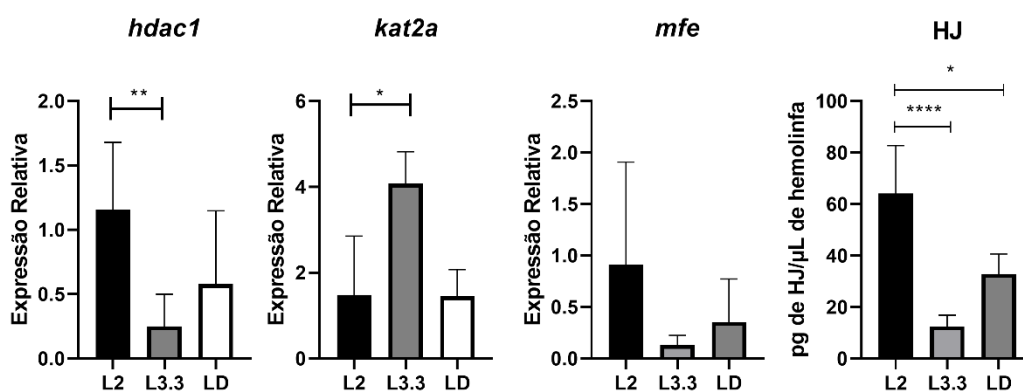
Em larva de *Melipona* não é possível identificar casta ou sexo e essas amostras podem apresentar valores de expressão mais elevados por serem de casta ou sexo diferentes das demais larvas analisadas. A análise de ROUT identificou essas amostras como *outliers* e elas foram retiradas das análises e comparações posteriores (Figura 6B).



**Figura 6:** Quantificação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em larvas de *Melipona scutellaris*. A) Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. B) Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR, após remoção de *outliers*. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn ( $P < 0.05$ ).

Há diferença estaticamente significativa para os transcritos dos genes *hdac1* e *kat2a* entre as fases L2 e L3-3. Os níveis de *hdac1* caem de L2 para L3-3 e os de *kat2a* se elevam, indicando que é necessária descondensação cromatínica para que o desenvolvimento larval se complete (Figuras 6B e 7). A expressão desses

transcritos relacionados a acetilação/desacetilação de histonas segue o mesmo perfil encontrado por Cardoso-Júnior et al. (2017b) para os transcritos de *mfe* e títulos de hormônio juvenil para as mesmas fases de desenvolvimento (Figura 7). A metil farnesoato epoxidase (MFE) é uma enzima limitante na etapa final de síntese de hormônio juvenil em insetos (GOODMAN; CUSSON, 2012). Esses dados indicam que mecanismos epigenéticos e hormonais podem atuar sinergicamente na regulação gênica durante o desenvolvimento larval de *Melipona scutellaris*.

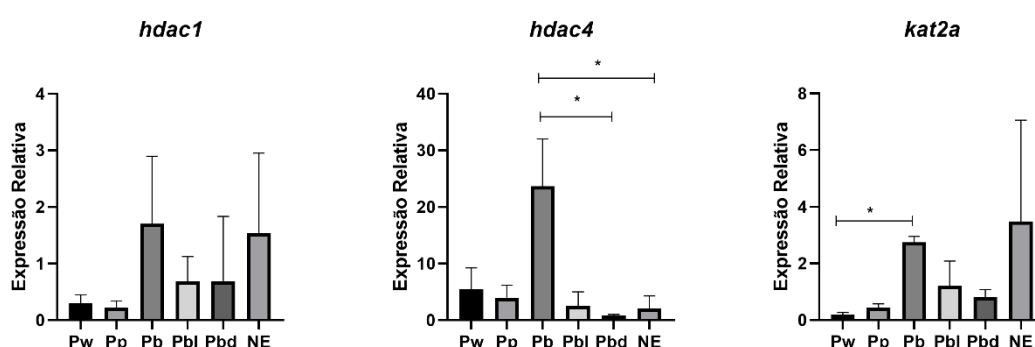


**Figura 7:** Comparação dos perfis de expressão de transcritos dos genes *hdac1*, *kat2a* e *mfe* e títulos de hormônio juvenil em larvas de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR e dos títulos de hormônio juvenil obtidos por radioimunoensaio. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn ( $P < 0.05$ ). Dados sobre *mfe* e HJ fornecidos por Cardoso-Júnior et al. (2017b).

Os dados encontrados para *Melipona scutellaris* diferem dos resultados obtidos para *Tribolium castaneum* (ROY; PALLI, 2018; GEORGE; GADDELAPATI; PALLI, 2019). Nessa espécie, altos títulos de hormônio juvenil suprimem a ação de HDAC1, sugerindo que as interações entre acetilação de histonas e biossíntese de hormônio juvenil variam entre as espécies de insetos.

#### 4.1.2 Níveis de Transcritos dos Genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em Pupas e Adultos Recém Emergidos de Operárias de *Melipona scutellaris*

Pupas e adultos recém emergidos de operárias (Figura 8) apresentaram expressão de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a*. Não houve diferença estatisticamente significativa de expressão de *hdac1* entre esses estágios de desenvolvimento. Houve diferença significativa para expressão de *hdac4* entre as Pb-Pbd e Pb-NE e para a expressão de *kat2a*, entre as fases Pw-Pb.

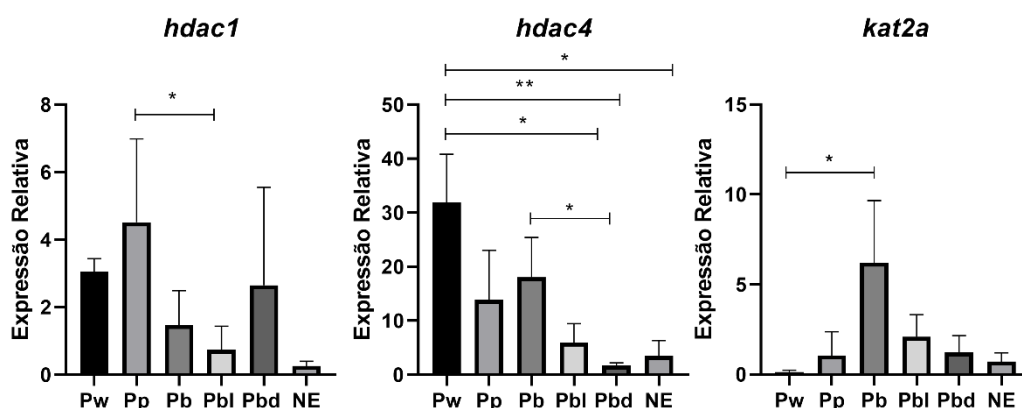


**Figura 8:** Quantificação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de operárias de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn ( $P < 0.05$ ).

Para os genes *hdac4* e *kat2a*, ocorre elevação dos níveis de transcritos de Pp para Pb, seguida por declínio após essa fase. Em *Melipona*, o pico nos títulos de ecdisterona ocorre em Pp, seguido por declínio a partir de Pb (PINTO et al., 2002). Loof et al. (2013) sugeriram que os ecdisteróides, além de sua ação clássica por meio de receptores, podem ter papel fundamental, e até agora negligenciado, no controle de processos fisiológicos, via mecanismos epigenéticos como demetilação de DNA ou modificações de histonas. A partir de nossos resultados, levanta-se a pergunta: como os títulos de ecdisteróides modulam a expressão de *hdac4* e *kat2a*? Esses ainda são mecanismos a serem elucidados.

#### 4.1.3 Níveis de Transcritos dos Genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em Pupas e Adultos Recém Emergidos de Rainhas de *Melipona scutellaris*

Pupas e adultos recém emergidos de rainhas (Figura 9) apresentaram expressão de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a*. Houve diferenças estatisticamente significativas de expressão de *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* entre esses estágios de desenvolvimento.

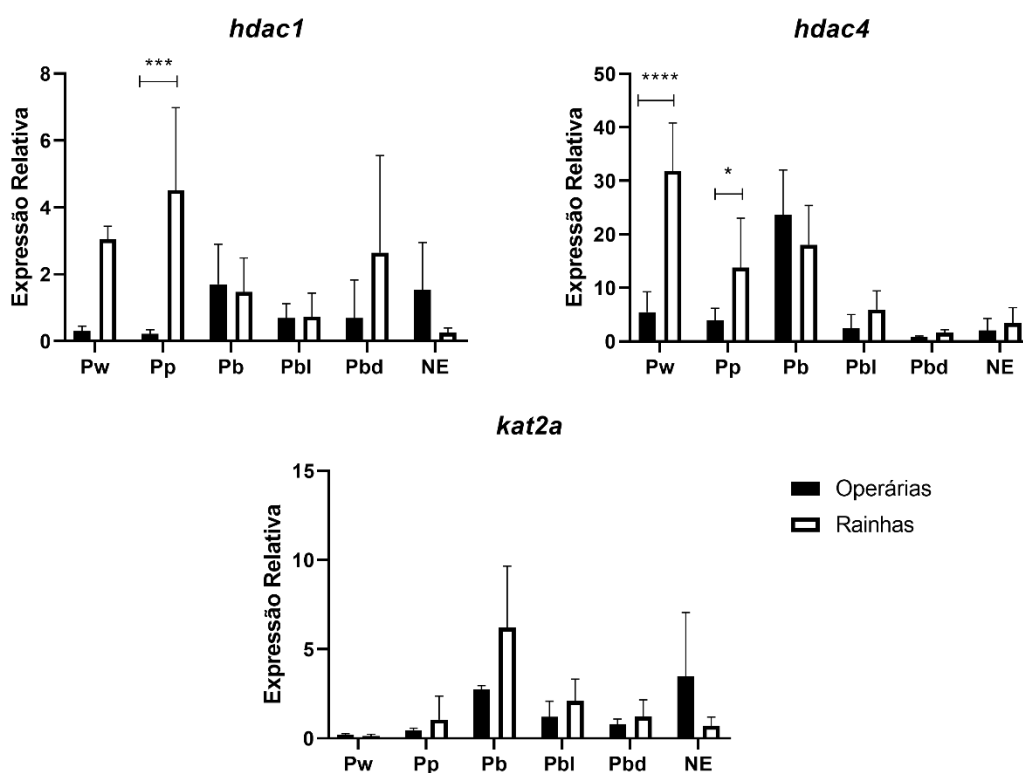


**Figura 9:** Quantificação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de rainhas de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. Análise estatística: Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn ( $P < 0.05$ ).

Em rainhas de *Melipona scutellaris*, os transcritos dos genes *hdac1* e *kat2a*, apresentam um perfil de declínio de expressão ao longo do desenvolvimento. Esses resultados podem indicar que seja necessário o remodelamento da cromatina para que genes casta-específicos fundamentais para o desenvolvimento de rainhas sejam expressos. Esse resultado reforça nossa hipótese de que, em *Melipona scutellaris*, genes casta-específicos, ou pelo menos parte deles, estejam sob o controle epigenético de acetilação e desacetilação de histonas.

#### 4.1.4 Comparação dos Níveis de Transcritos dos Genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em Pupas e Adultos Recém Emergidos entre as Castas de *Melipona scutellaris*

A Figura 10 mostra a comparação dos níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de operárias e rainhas de *Melipona scutellaris*. Em pupas de olho branco (Pw) houve diferença estatística da média da expressão de *hdac1* entre operárias e rainhas e, em pupas de olho branco (Pw) e pupas de olho rosa (Pp) houve diferença estatística da média da expressão de *hdac4*.



**Figura 10:** Níveis de transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a* em pupas e adultos recém emergidos de operárias e rainhas de *Melipona scutellaris*. Representação gráfica (média e desvio padrão) da quantificação relativa dos genes obtida por RT-qPCR. Análise estatística: 2Way-ANOVA, pós-teste de Dunn ( $P < 0.05$ ).

A maior expressão de transcritos dos genes de *hdac1* e *hdac4* nos primeiros estágios em pupa de rainhas de *Melipona scutellaris* podem ser explicadas pelo desequilíbrio, não casual, de histonas acetiladas em rainhas e operárias o que,

por meio do processo de remodelagem da cromatina, pode promover um controle pontual e refinado na expressão dos genes casta-dependentes. Modificações epigenéticas podem representar uma associação entre genótipo e ambiente no desenvolvimentos dos fenótipos divergentes em gêmeas de *Melipona* durante o desenvolvimento (CARDOSO-JÚNIOR et al., 2017a).

#### **4.2 Tratamento de larvas de *Melipona scutellaris* com Hormônio Juvenil III**

Segundo o mecanismo genético-alimentar para diferenciação de castas em *Melipona*, larvas heterozigotas para os dois *loci* se desenvolveriam em rainhas por sintetizarem níveis elevados de hormônio juvenil, ativando genes feminizantes. No entanto, a integração entre hormônio juvenil e a reprogramação gênica que leva à diferenciação em rainhas em abelhas sem ferrão ainda é uma pergunta não totalmente respondida (CARDOSO-JÚNIOR et al., 2017a).

A indução de rainhas com tratamento com hormônio juvenil e seus análogos em larvas de *Melipona* foi extensivamente demonstrada (CAMPOS; VELTHUIS-KLUPPELL; VELTHUIS, 1975; CAMPOS, 1978; BONETTI, 1983; BONETTI, 1984; BONETTI; CRUZ-LANDIM; KERR, 1994; BONETTI; KERR; MATUSITA, 1995). Nessa nossa investigação, no entanto, não tivemos sucesso na reprodução dos dados da literatura. Mais de mil larvas, em final de L3-3 e LPD, retiradas de oito colmeias com ninhos fortes, ao longo de vários meses, foram tratadas com concentrações de Hormônio Juvenil III variando entre 0,5 µg e 5 µg HJ III/ µL acetona. As larvas tratadas apresentaram alta mortalidade em larva e pupa, atraso na metamorfose larva-pupa, metamorfose incompleta, não diferenciação em rainha, desenvolvimento de rainhas muito pequenas, além de defeitos morfológicos nos imagos (falta de asas, asas atrofiadas). Comparativamente, os indivíduos dos grupos Controle mostraram desenvolvimento normal, dentro do tempo esperado e eclosão de rainhas e operárias sem alterações fenotípicas.

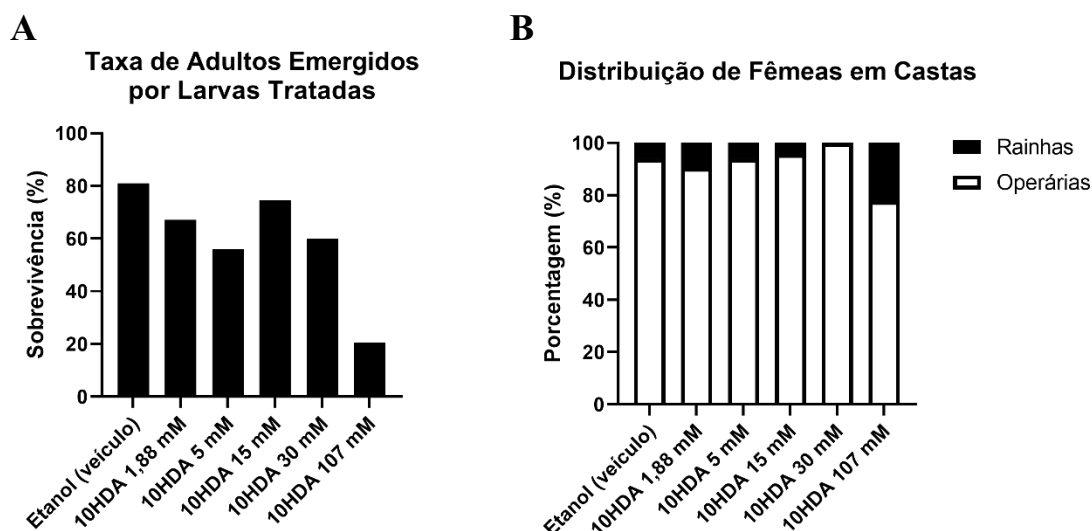
Bonetti (1982) demonstrou que as larvas de *Melipona* são mais responsivas à aplicação de Hormônio Juvenil I, que, atualmente, não é disponibilizado comercialmente. A literatura recente mostra que tem sido utilizado, mais frequentemente, análogos de hormônio juvenil, ainda que não haja relatos científicos sobre falha de eficiência do reagente Hormônio Juvenil III. Os

resultados obtidos nesse trabalho não podem ser atribuídos à criação, manipulação ou tratamento inadequados das larvas, visto os resultados obtidos para os Grupos Controle. A única explicação plausível que encontramos para os resultados que obtivemos é a de que o lote do reagente que utilizamos apresente alguma diferença em relação aos anteriormente utilizados no laboratório. Para testar essa hipótese, avaliaremos a toxicidade e os efeitos de análogos do Hormônio Juvenil na diferenciação de castas de *Melipona scutellaris*.

#### **4.3 Tratamento de larvas de *Melipona scutellaris* com Ácido 10-hidróxi-2E-decenóico**

Inibidores de histona desacetilases (HDACis) são compostos químicos que inibem a atividade das enzimas histona desacetilases, provocando hiperacetilação e influenciando na expressão gênica (HU et al., 2018). O ácido 10-hidróxi-2E-decenóico (10HDA) é um HDACi encontrado na geleia real de *Apis mellifera*, que foi proposto como um dos componentes capazes de induzir a diferenciação em rainhas nessas abelhas. O 10HDA é um inibidor de amplo espectro de histonas desacetilases das classes I e II (SPANNHOFF et al., 2011).

Em nossa investigação, larvas de *Melipona scutellaris* nos estágios L3-3 e LPD (terceiro instar larval) foram tratadas com 10HDA nas concentrações de 1,88 mM; 5 mM; 15 mM; 30 mM e 107 mM. A menor concentração foi escolhida devido ao 10HDA ser capaz de desencadear efeitos epigenéticos regulatórios em cultura de células a partir de 0,5 mM e a maior por ser a concentração mínima que larvas de *Apis mellifera* destinadas a serem rainhas são expostas (SPANNHOFF et al., 2011). Nenhuma das cinco concentrações testadas foi capaz de induzir a diferenciação das larvas em rainhas e a concentração mais elevada (107 mM) causou alta mortalidade (79,55%) (Figura 11).



**Figura 11:** Efeitos do tratamento de larvas de *Melipona scutellaris* no terceiro instar larval com 10HDA. A) Taxa de sobrevivência. B) Distribuição das fêmeas em castas, rainha e operária.

George; Gaddelapati; Palli (2019) demonstraram que, em *Tribolium castaneum*, as HDACs são essenciais para a sobrevivência de larvas, pupas e adultos e *knockdown* de *hdac1* ou de *hdac11* em larvas leva a 100% de mortalidade. Em nossos resultados, o aumento da mortalidade das larvas tratadas com concentrações elevadas de HDACi corroboram o obtido por esses autores.

Períodos críticos no desenvolvimento são representados por intervalos em que um organismo é especialmente sensível a estímulos ambientais. Na diferenciação de castas de insetos, esses períodos indicam sensibilidade aumentada para alguns hormônios regulatórios, como o hormônio juvenil (OPACHALOEMPHAN et al., 2018). Bonetti; Kerr; Matusita (1995) demonstraram que a aplicação de hormônio juvenil em larvas de *Melipona*, na janela temporal que corresponde ao final do terceiro instar larval (estágios de L3-3 até LPD) leva à diferenciação das larvas em rainhas, o tratamento antes desse período provoca mortalidade e depois dessa janela, não promove a diferenciação. Nesse trabalho, realizamos as aplicações de 10HDA no mesmo intervalo temporal em que as larvas de *Melipona scutellaris* são sensíveis à aplicação de hormônio juvenil, no entanto, elas não foram responsivas ao HDACi testado. Uma explicação é que a janela temporal em que a acetilação de histonas possa desempenhar efeito na diferenciação de castas seja anterior à janela do hormônio juvenil.



Outra explicação é a de que a aplicação de doses únicas de 10HDA não seja suficiente para desencadear reprogramação gênica casta-específica. Nesse caso, aplicações sequenciais de 10HDA ao longo do desenvolvimento devem ser testadas para avaliação do seu efeito na indução de fenótipo de rainha.

Roy; Palli (2018) demonstraram, em *Tribolium castaneum*, que tratamento com Tricostatina A, um HDACi, provoca aumento dos transcritos do fator de transcrição *Krüppel-homolog 1* (*Kr-h1*). O mesmo grupo demonstrou, em outro trabalho, que o tratamento com hormônio juvenil leva à diminuição dos transcritos de *hdac1* e aumento dos transcritos de *Kr-h1*. Verificaram que o *knockdown* de *hdac1* leva ao aumento dos transcritos dos genes responsivos ao hormônio juvenil, *Kr-h1* e *4EBP*. Verificaram, ainda, que tanto *knockdown* de *hdac1* quanto tratamento com hormônio juvenil levam ao aumento global da acetilação de histonas e aumento da acetilação na região promotora de *Kr-h1*. Esses autores hipotetizaram que títulos altos de hormônio juvenil suprimem a ação de HDAC1 e permitem a expressão de *Kr-h1* e, que, na transição para o período de pupa, a queda dos títulos de hormônio juvenil permitem a supressão de *Kr-h1* pela desacetilação da sua região promotora via ação de HDAC1 (GEORGE; GADDELAPATI; PALLI, 2019).

Verificamos, em nossa pesquisa, resultados diferentes para o tratamento com 10HDA e com hormônio juvenil, uma vez que o hormônio juvenil é capaz de promover a indução de rainha e o HDACi não foi eficaz para a diferenciação em rainhas. Drogas com atividade HDACi variam em suas habilidades de inibir diferentes isoformas de HDAC, então não se pode esperar efeitos idênticos de HDACis diferentes (LOCKETT et al., 2014). Da mesma maneira, a discrepância no efeito do tratamento com 10HDA dos resultados encontrados para o *knockdown* de *hdac1* em *Tribolium castaneum* pode ser a atribuída às diferentes capacidades de inibição desses dois tratamentos e às diferenças das espécies analisadas.

As hipóteses que podemos levantamos para os resultados obtidos com 10HDA são: 1) aplicação de 10HDA em janela temporal não responsiva; 2) o efeito ser dependente de aplicações repetidas de 10HDA; 3) falta completa ou parcial de eficiência em aumentar os níveis de acetilação de histona para provocar reprogramação gênica casta-específica e 4) apenas a acetilação de histonas não

ser suficiente, sendo necessário o recrutamento e associação de mais de um mecanismo epigenético para o estabelecimento de expressão gênica casta-específica em *Melipona*.

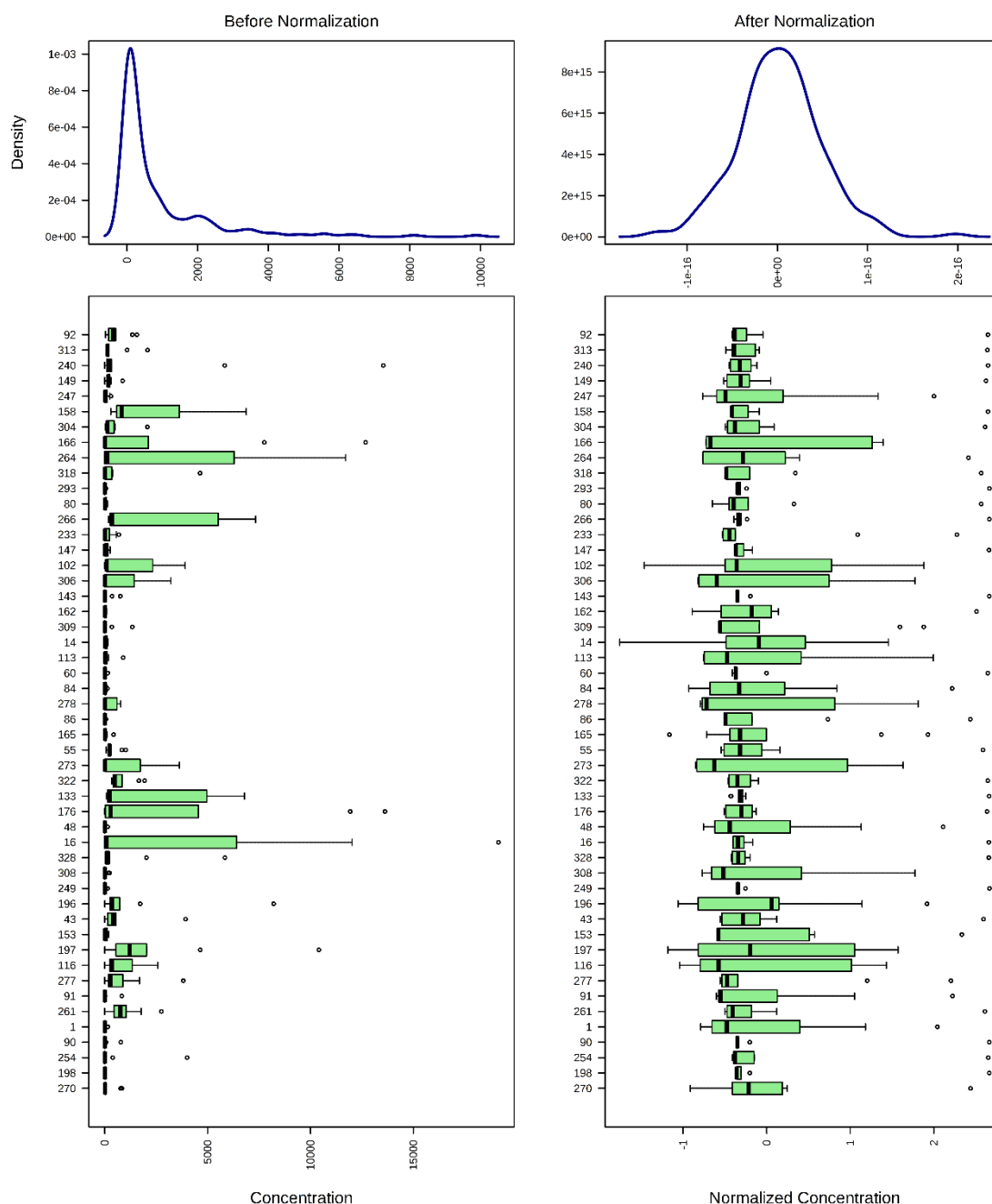
#### **4.4 Metabolômica**

O termo metabolismo define uma série de complexas reações, essenciais para manutenção dos processos vitais. Coletivamente, o metabolismo possui três funções essenciais: 1) geração de ATP, para que as atividades celulares que consomem energia possam ocorrer; 2) produção de intermediários glicolíticos que são importantes nas reações anabólicas e 3) geração de metabólitos que atuam como substratos, cofatores ou inibidores de diversas reações enzimáticas envolvidas em modificações epigenéticas e regulação gênica (THAKUR; CHEN, 2019).

Células em condições metabólicas, estabelecidas pela disponibilidade de nutrientes, estímulos externos e seu estado metabólico intrínseco, produzem grupos de metabólitos específicos. Esses pequenos intermediários metabólicos podem ser o denominador comum entre a metabolismo energético e a regulação gênica (YUN et al., 2012; MENTCH; LOCASALE, 2015; ZHANG, 2018; THAKUR; CHEN, 2019). O fato de o epigenoma ser sensível ao estado metabólico das células nos levou a investigar se há modificações metabólicas ao longo do desenvolvimento larval de *Melipona scutellaris* relacionadas a mecanismos epigenéticos e sinalização hormonal, que possam estar associados à diferenciação de castas em abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*.

##### **4.4.1 Metabolômica de Larvas**

Na análise metabolômica de larvas, as concentrações dos metabólitos foram primeiramente normalizadas pela massa (g) de cada larva/amostra. Em seguida, os valores foram normalizados pela média e desvio padrão de cada grupo (Figura 12).

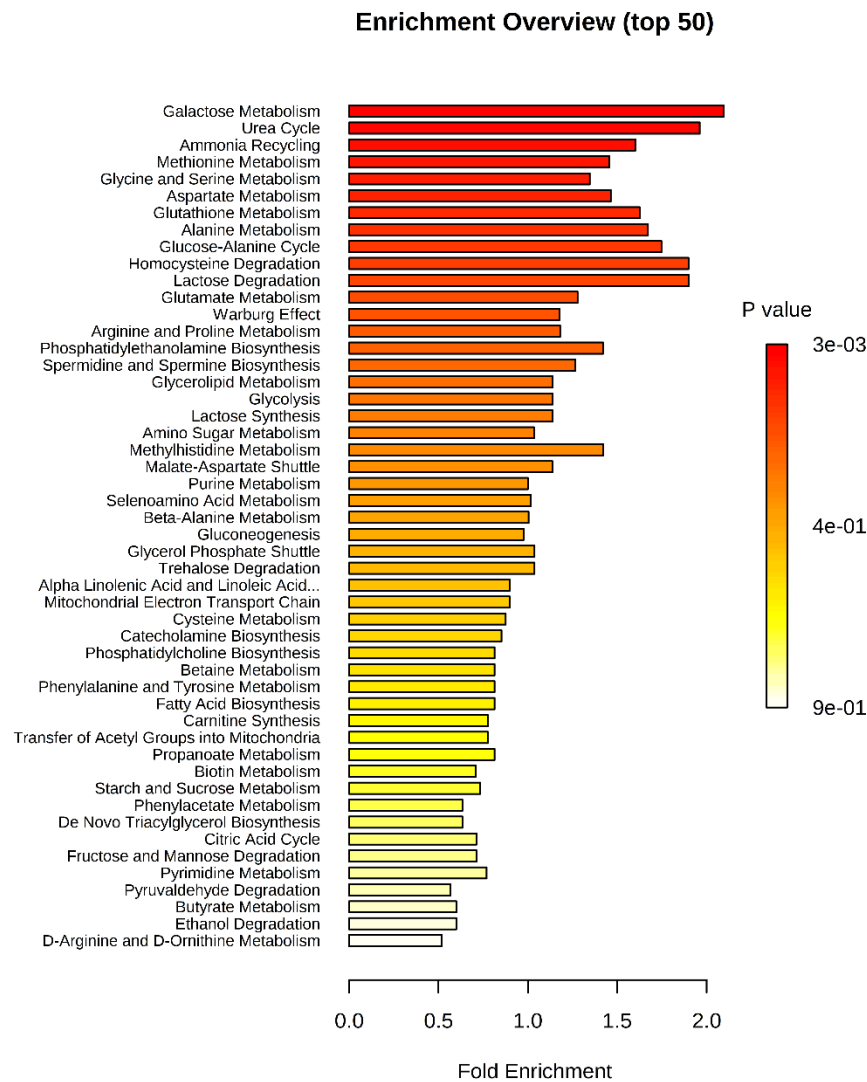


**Figura 12:** Distribuição das concentrações dos metabólitos de larvas de *Melipona scutellaris* antes (à esquerda) e depois (à direita) da normalização. *Boxplots* e gráficos de densidade de Kernel antes e depois da normalização. Os *boxplots* mostram 50 compostos devido ao limite de espaço. Os gráficos de densidade são baseados em todas as amostras.

A análise metabolômica de larvas permitiu identificar e quantificar, pela primeira vez, os metabólitos presentes durante o desenvolvimento larval de *Melipona scutellaris*. Foram identificados 329 metabólitos (Anexo I) com

concentrações que variam nas fases larvais (L2, L3-3 e LD) e entre amostras da mesma fase.

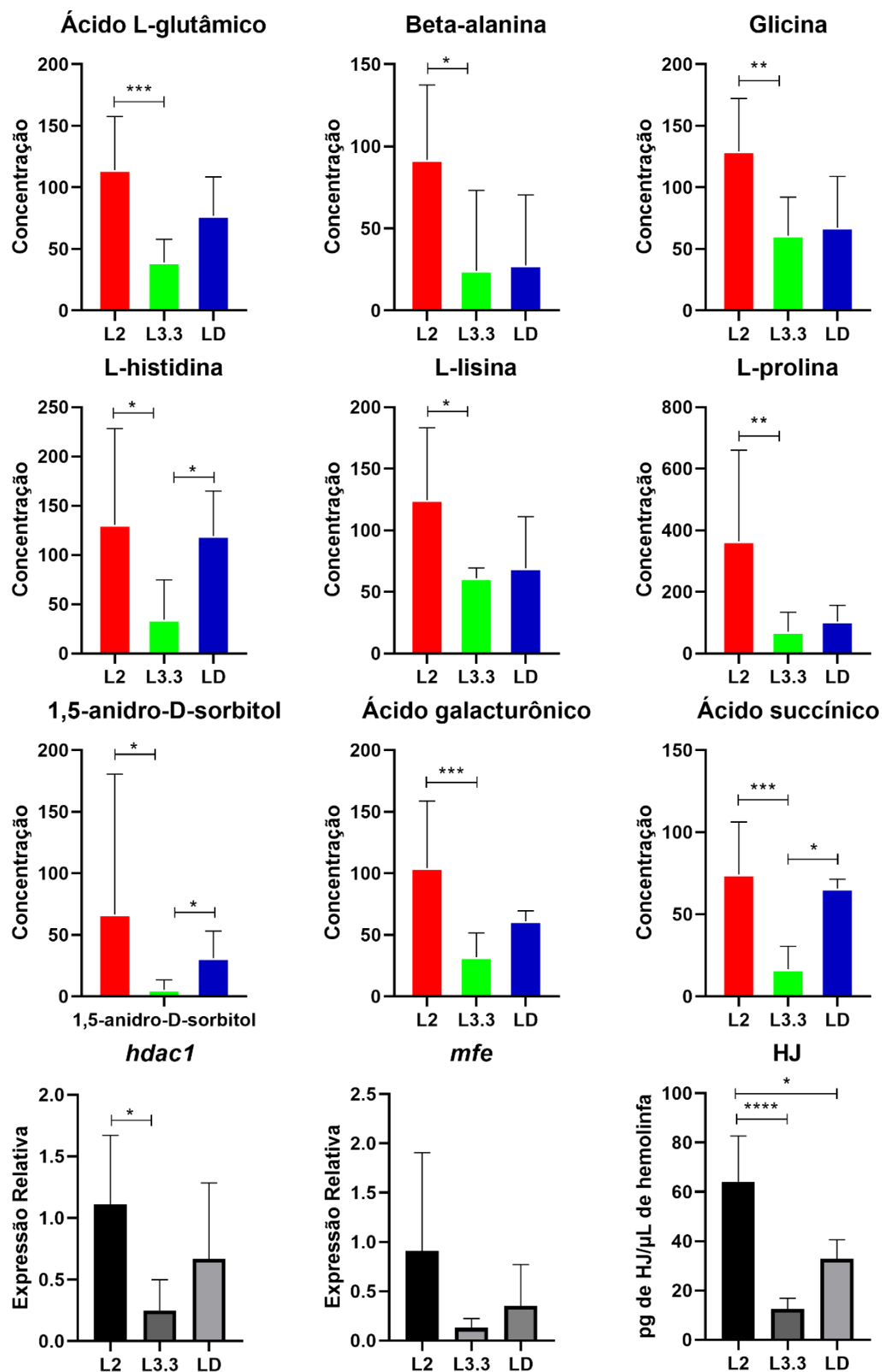
A análise de enriquecimento de funções indica que, dentre os 329 metabólitos encontrados, há enriquecimento significativo para metabólitos relacionados ao metabolismo da galactose e ao ciclo da ureia ( $P < 0.05$ ) (Figura 13).



**Figura 13:** Análise de Enriquecimento dos metabólitos encontrados em larvas de *Melipona scutellaris*.

Ao analisar individualmente o perfil de concentração de cada metabólito, ao longo do desenvolvimento larval, identificamos nove que seguem o mesmo perfil de expressão dos genes *mfe* e *hdac1* e dos títulos de hormônio juvenil nas

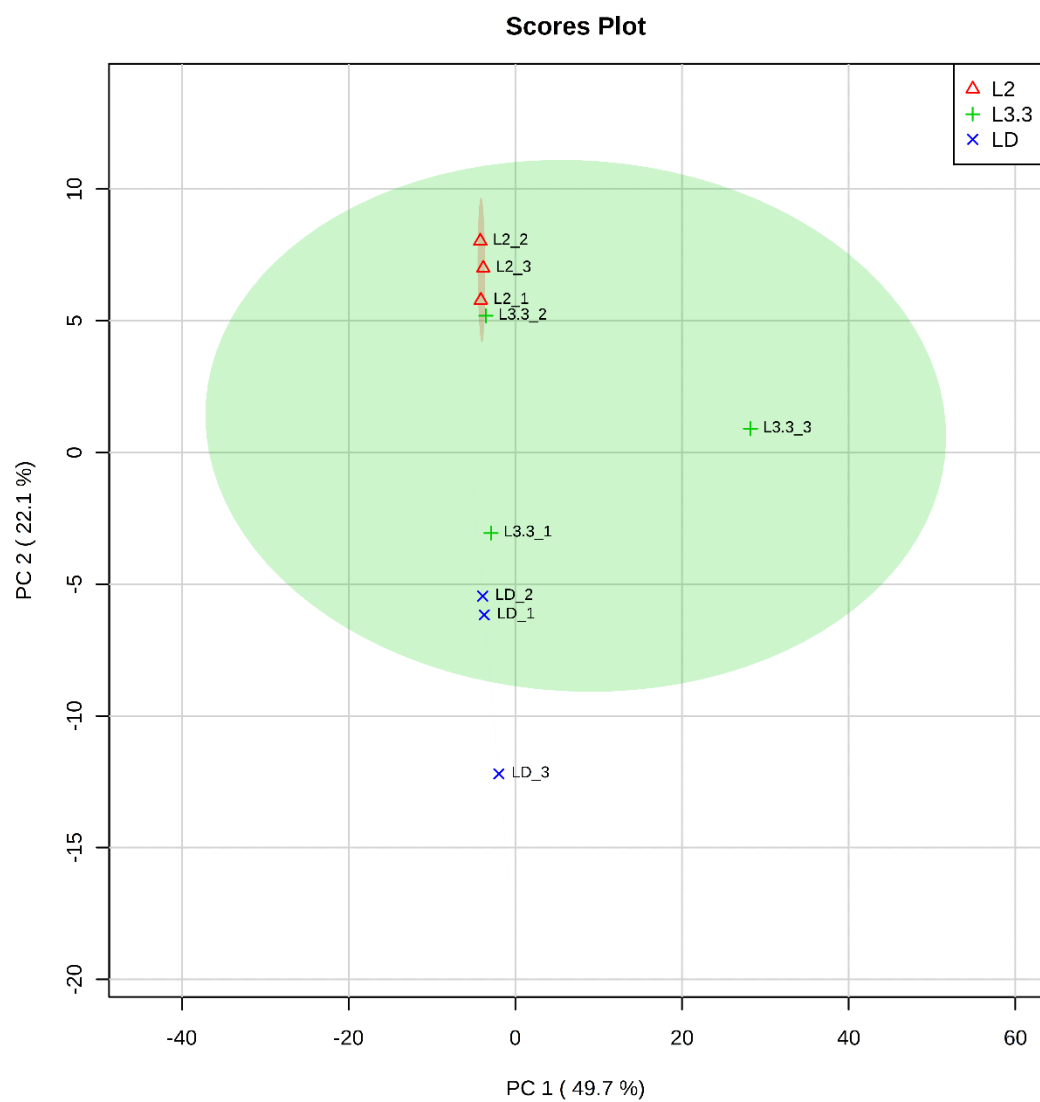
mesmas fases (Figura 14). Desses, sei são aminoácidos (essenciais: L-histidina e L-lisina; não-essenciais: ácido L-glutâmico; beta-alanina; glicina; e L-prolina) e outros três são 1,5-anidro-sorbitol, ácido galacturônico e ácido succínico. Esses compostos podem fornecer energia e esqueleto carbônico para os processos morfogênicos e de remodelamento tecidual que ocorrem ao longo do desenvolvimento larval, coordenados pelos títulos de hormônio juvenil e por reprogramação gênica.



**Figura 14:** Compostos e perfil de expressão dos genes *hdac1*, *mfe* e dos títulos de hormônio juvenil durante o desenvolvimento larval de *Melipona scutellaris*. Análise estatística: Kruskal-

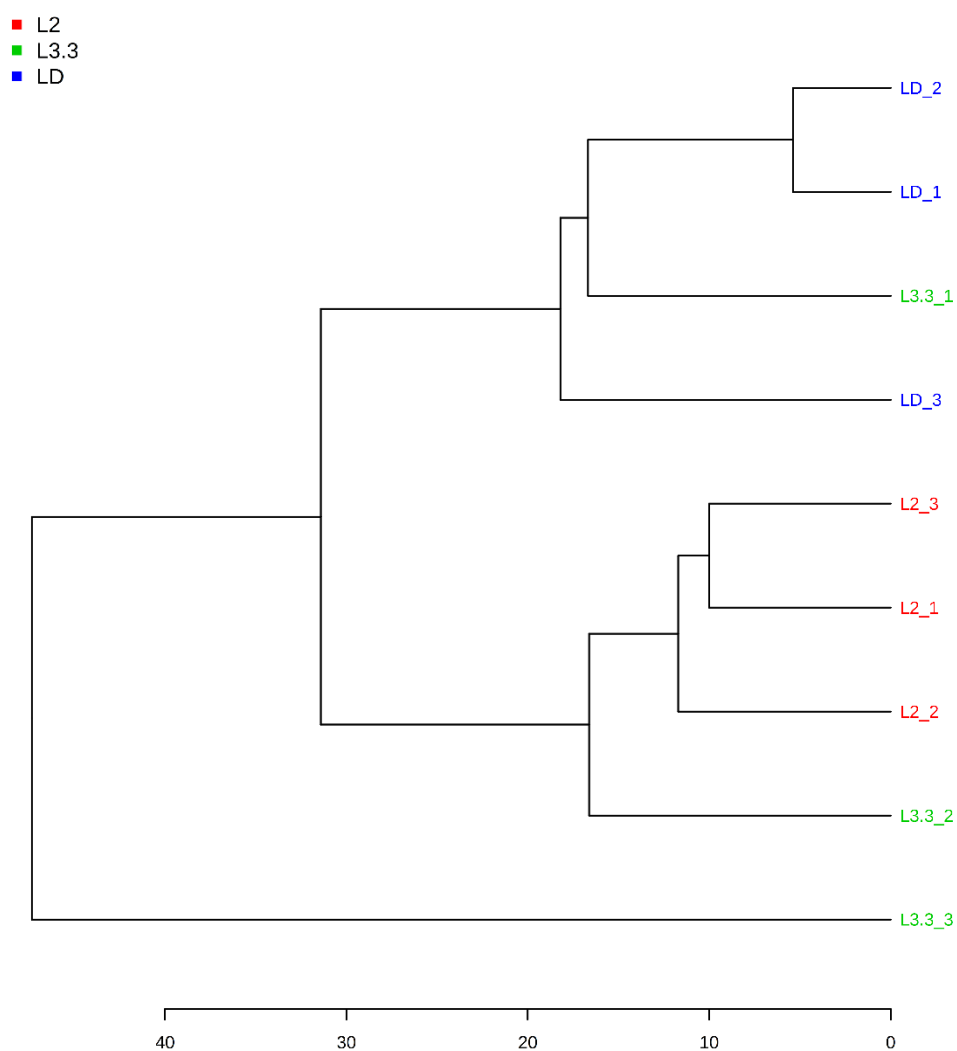
Wallis, pós-teste de Dunn ( $P < 0.05$ ). Dados sobre *mfe* e HJ fornecidos por Cardoso-Júnior et al. (2017b).

A Análise de Componente Principal (PCA) não foi capaz de discriminar as amostras em grupos correspondentes às três fases larvais analisadas (L2, L3-3 e LD). A Figura 15 mostra que cada amostra de L3-3 encontra-se em extremidades opostas do único grupo formado. Já a análise do dendograma (Figura 16) mostra que cada uma das três amostras de L3-3 foi separada em um *cluster* diferente e que a amostra L3-3\_3 forma um *cluster* isolado. A análise de correlação entre as amostras (Figura 17) indica correlação positiva entre as amostras pertencentes ao mesmo grupo para as fases larvais L2 e LD e, em contraste, as amostras L3-3 apresentam correlação muito baixa ou até negativa entre si.

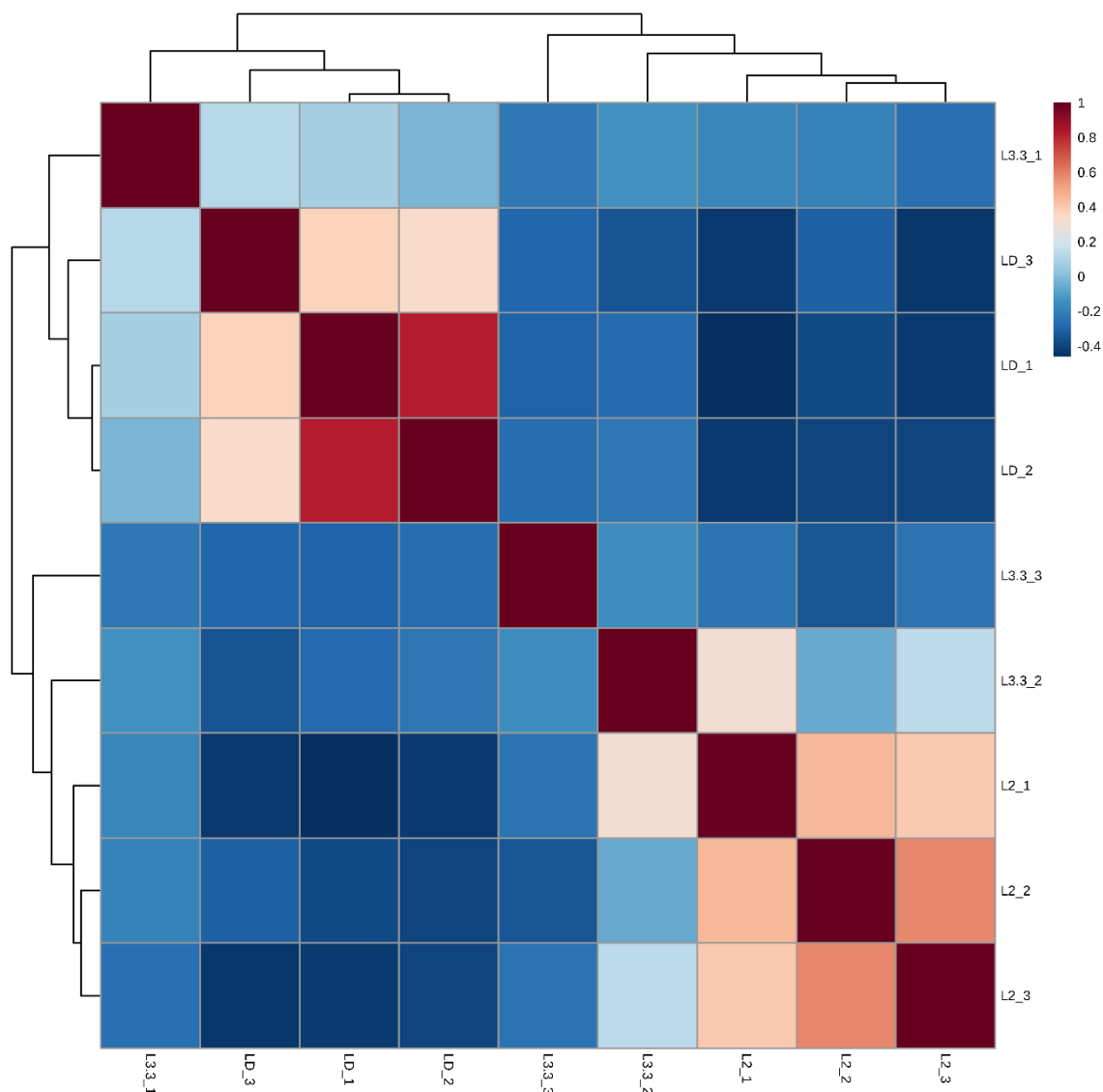


**Figura 15:** Análise de Componente Principal (PCA) de perfil metabólico de larvas de *Melipona scutellaris*.



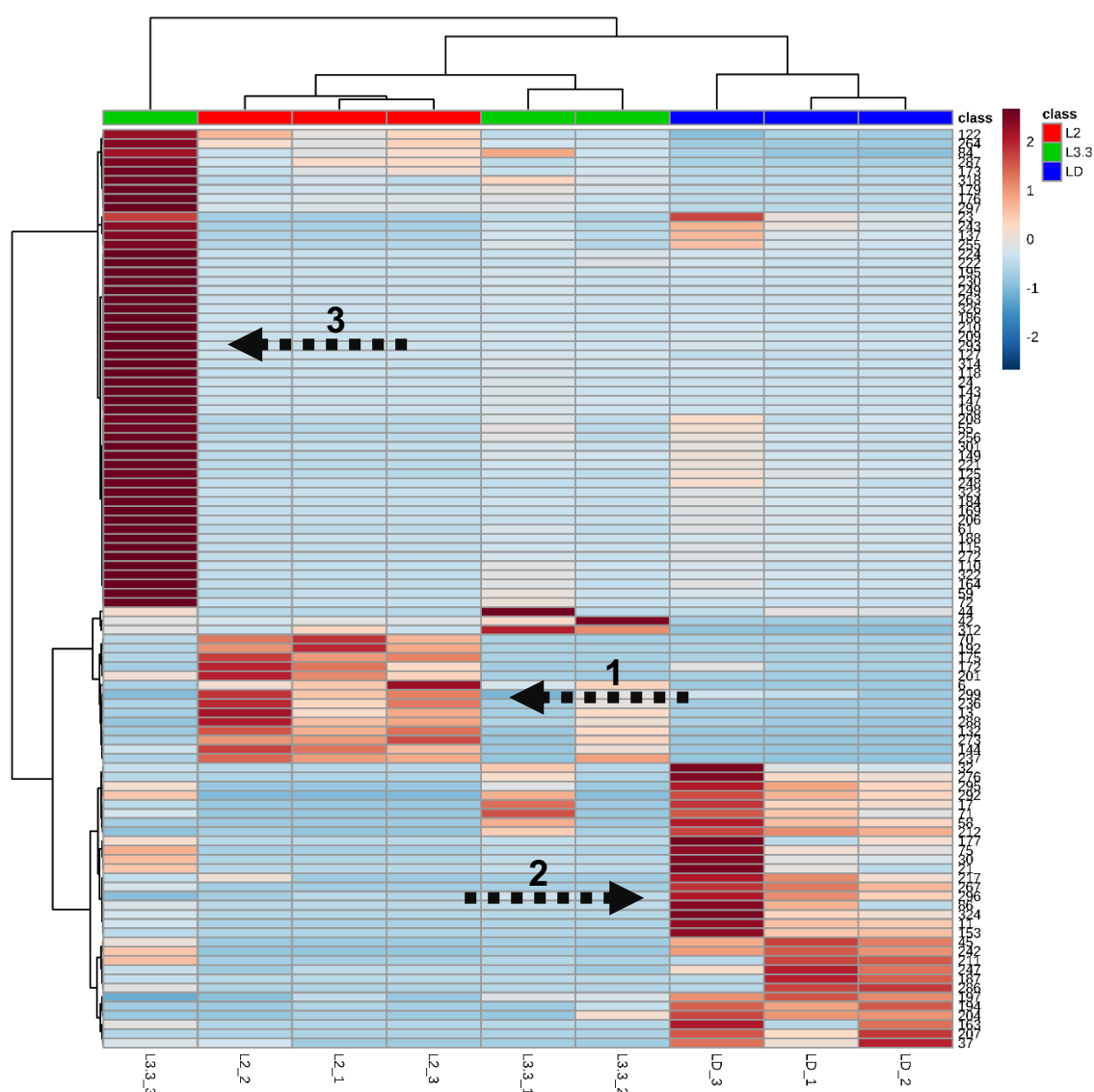


**Figura 16:** Dendrograma (Distância euclidiana, algoritmo de Ward) gerado a partir do perfil metabólico de larvas de *Melipona scutellaris*.



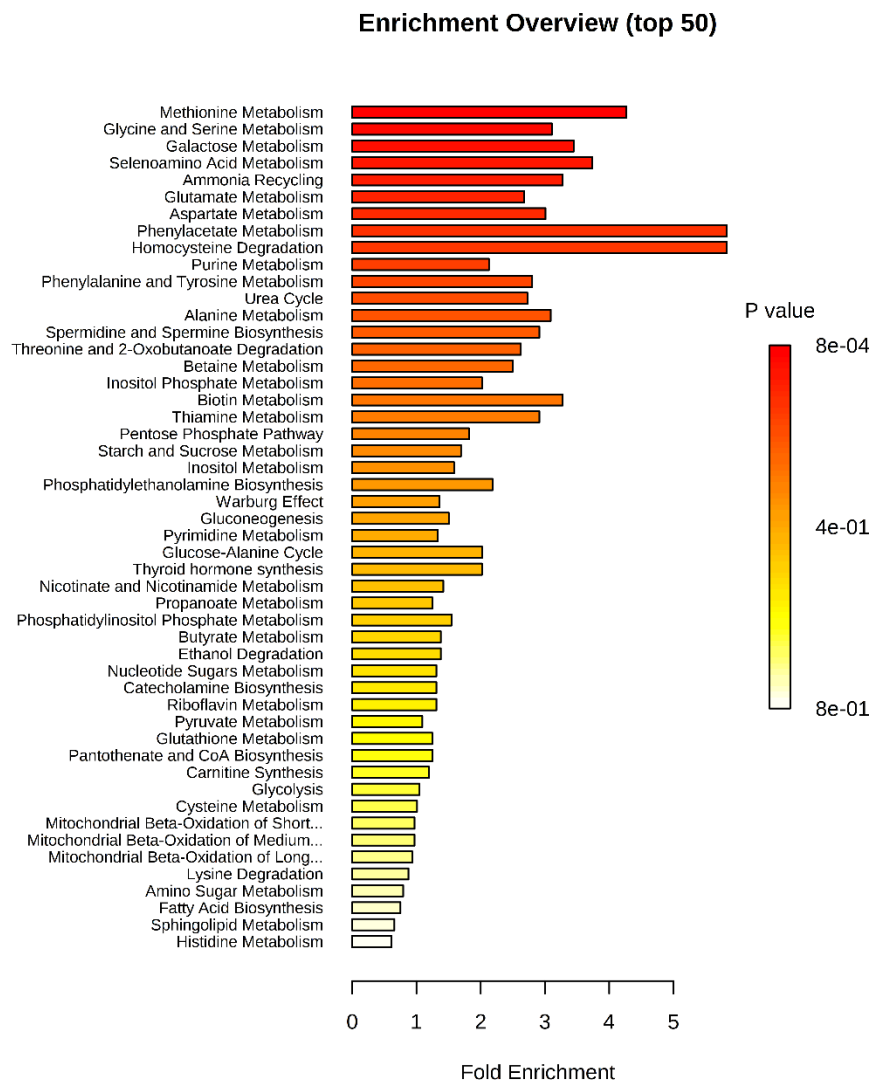
**Figura 17:** Análise de correlação de Pearson de perfil metabólico de larvas de *Melipona scutellaris*.

O *heatmap* (Figura 18) dos 100 metabólitos com maiores diferenças de concentração ( $P < 0.05$ ) indica três grupos de compostos: Grupo 1: metabólitos com concentrações mais elevadas em L2; Grupo 2: metabólitos com concentrações mais elevadas em LD; Grupo 3: metabólitos com concentrações elevadas na amostra L3-3\_3 e concentrações baixas em todas as outras amostras. É possível notar, também, que a amostra LD\_3 apresenta perfil de concentração de metabólitos diferente das outras amostras do grupo, ainda que essa diferença não seja tão acentuada quanto à verificada na comparação dos compostos do Grupo 3.

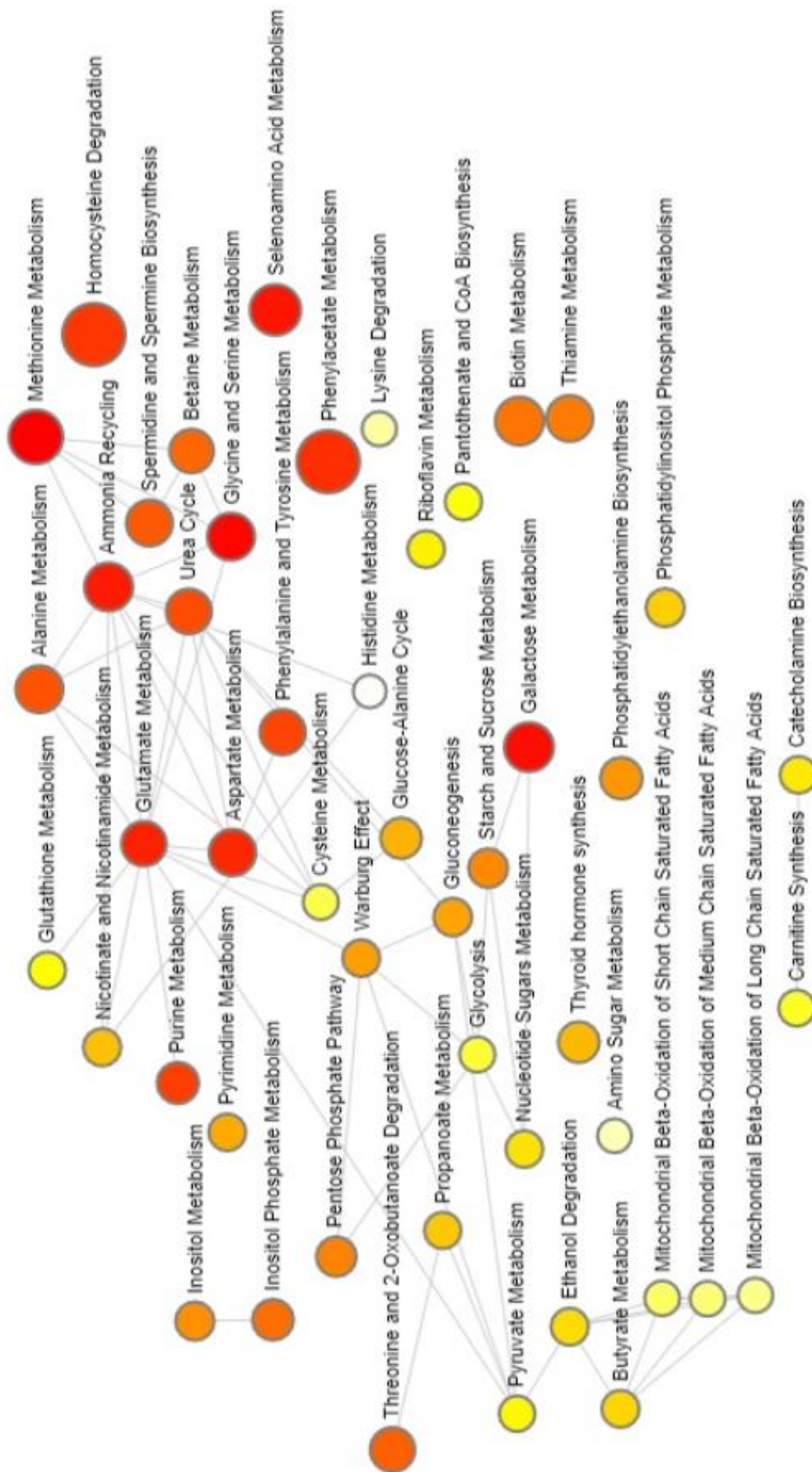


**Figura 18:** *Heatmap* indicando os 100 metabólitos com maiores diferenças de concentração (Teste T –  $P < 0.05$ ). As setas indicam os grupos de compostos.

A análise de enriquecimento de funções (Figuras 19 e 20) dos 52 metabólitos pertencentes ao Grupo 3 (metabólitos com concentrações elevadas na amostra L3-3\_3), identificados pelo *heatmap*, mostrou enriquecimento significativo para funções relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e de galactose (Metabolismo de: Metionina, Glicina e Serina, Glutamato, Seleno-aminoácidos, Aspartato, Fenilacetato, Galactose; Reciclagem de Amônia; Degradação de Homocisteína –  $P < 0,05$ ).

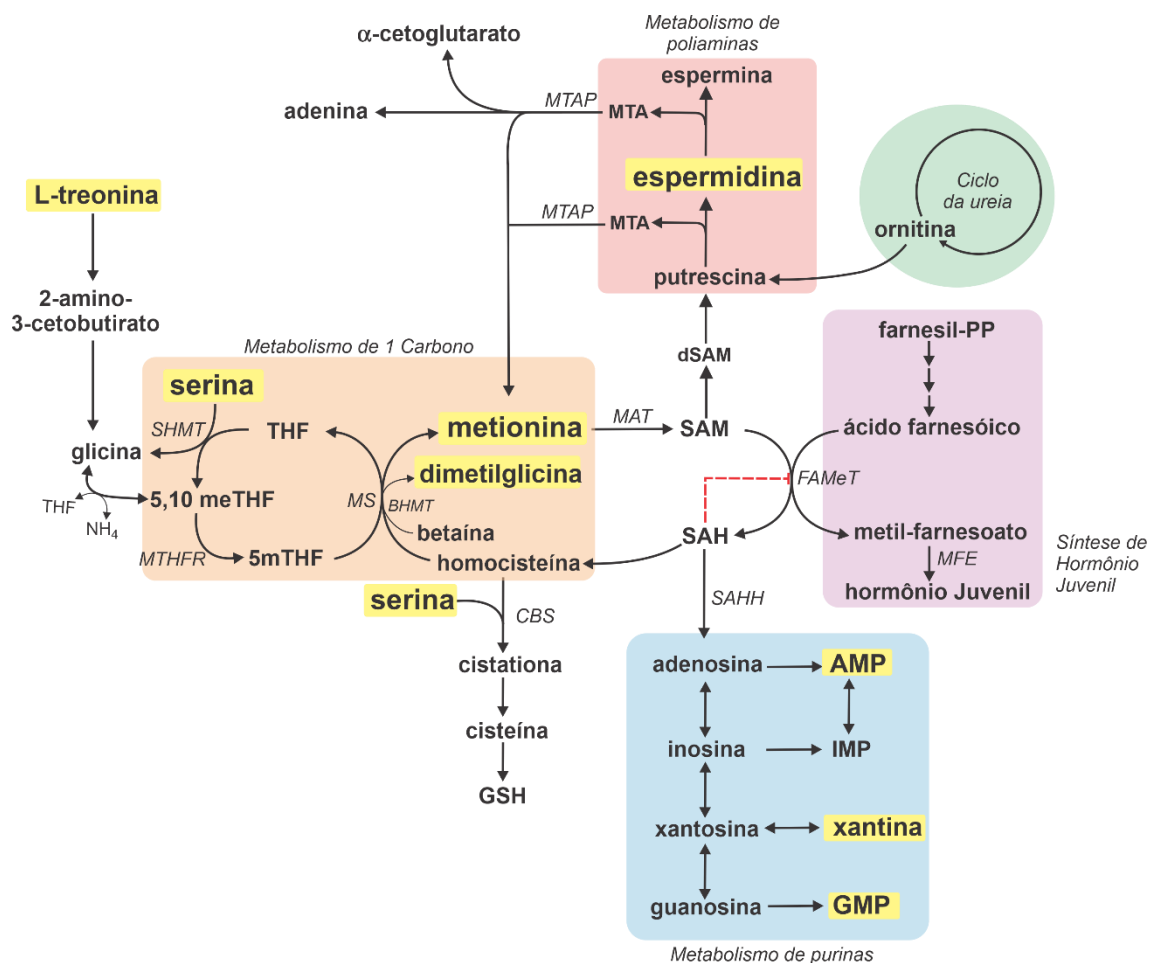


**Figura 19:** Análise de Enriquecimento dos metabólitos do Grupo 3 (metabólitos com concentrações elevadas na amostra L3-3\_3) identificados pelo *heatmap*.



**Figura 20:** Análise de Enriquecimento dos metabólitos do Grupo 3 (metabólitos com concentrações elevadas na amostra L3-3\_3) identificados pelo *heatmap*. Cada nó representa uma função metabólica, a cor é baseada no valor de P e o tamanho no grau de enriquecimento. Duas funções metabólicas estão conectadas por uma linha, se o número de metabólitos que elas compartilham é superior a 25% do número total de metabólitos das duas funções combinadas.

A principal via bioquímica que regula a metilação de DNA, histonas e outros compostos intracelulares é o ciclo da metionina, no qual a S-adenosilmetionina (SAM) atua como doadora de grupo metil na presença de metiltransferases (ULREY et al., 2005; IGLESIAS GONZÁLEZ et al., 2015; MENTCH; LOCASALE, 2015). No ciclo, a SAM é gerada pela adenilação da metionina pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT). Após a transferência do grupo metil da SAM para o substrato aceptor, é formada a S-adenosilhomocisteína (SAH). Por sua vez, a SAH é hidrolisada a adenina e homocisteína pela SAH hidrolase (SAHH). *In vivo*, essa reação ocorre nessa direção desde que os produtos sejam removidos para outras vias metabólicas. Caso não ocorra essa remoção, a reação reversa é mais favorável, aumentando as concentrações de SAH. A homocisteína pode entrar na via de transsulfuração e condensar com serina para gerar cistationa, em uma reação irreversível catalisada pela cistationa  $\beta$ -sintase (CBS). A homocisteína pode, ainda, ser utilizada por duas enzimas para regenerar metionina (remetilação). A betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) transfere um grupo metil da betaína, regenerando a molécula de metionina e produzindo uma dimetilglicina. Já a 5-metiltetrahydrofolato-homocisteína metiltransferase (MS), que tem a cobalamina (B12) como cofator, regenera a metionina pela transferência de um grupo metil do 5-metiltetrahydrofolato para homocisteína produzindo tetrahydrofolato (THF) (ULREY et al., 2005; IGLESIAS GONZÁLEZ et al., 2015; MENTCH; LOCASALE, 2015; ZHANG, 2018; THAKUR; CHEN, 2019). Essa via bioquímica está representada na Figura 21.



**Figura 21:** Integração dos metabolismos de compostos de 1 carbono, purinas, poliaminas e síntese de hormônio juvenil. Os metabólitos destacados em amarelo apresentam concentrações elevadas na amostra L3-3\_3 (Grupo 3 do *heatmap*). A seta pontilhada vermelha indica inibição da FAMEt por altos níveis de SAH. AMP: adenosina monofosfato; BHMT: betaína-homocisteína metiltransferase; CBS: cistationa β-sintase; dSAM: S-adenosilmetionina descarboxilada; FAMEt: *farnesoic acid O-methyl transferase*; GMP: guanosina monofosfato; GSH: glutatona; IMP: inosina monofosfato; MAT: metionina adenosiltransferase; MFE: metil farnesoato epoxidase; MS: 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase; MTA: 5-metiltioadenosina; MTAP: 5-metiltioadenosina fosforilase; MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase; SAH: S-adenosilhomocisteína; SAHH: S-adenosilhomocisteína hidrolase; SAM: S-adenosilmetionina; SHMT: serina hidroximetiltransferase; THF: tetrahidrofolato; 5,10meTHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato; 5mTHF: 5-metiltetrahidrofolato.

Conjuntamente, os ciclos da metionina e do folato são referidos como metabolismo de 1 carbono. A serina contribui para esse metabolismo via reação da serina hidroximetiltransferase, em que o THF é reversivelmente convertido a

5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>THF) na síntese de glicina. O 5,10-CH<sub>2</sub>THF é então convertido a 5-metiltetrahidrofolato, pela metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), podendo fornecer um grupo metil para regeneração da metionina (ULREY et al., 2005). O metabolismo de 1 carbono fornece, também, precursores da biossíntese de purinas, ao degradar SAH em adenina e homocisteína (Figura 21).

Os níveis de SAM são influenciados, também, pela síntese de poliaminas. A síntese de poliaminas usa SAM descarboxilada (dSAM) para a produção de espermidina e espermina a partir de putrescina, gerando 5-metiltioadenosina (MTA). A MTA é reciclada em metionina por uma série de reações catalisadas pela MTA fosforilase (MTAP), produzindo também adenina que leva ao aumento da concentração de purinas (Figura 21) (LI et al., 2017; LOZOYA et al., 2018).

A relação entre as concentrações de SAM/SAH é referida como index de metilação. Um alto index favorece as reações de metilação, uma vez que a SAH inibe as atividades da maioria das metiltransferases dependentes de SAM, em um mecanismo de feedback negativo. Assim, a degradação dos produtos da reação catalisada pela SAHH é vital para atender às demandas de metilação na célula (Figura 21) (ULREY et al., 2005; LI et al., 2017; LOZOYA et al., 2018; ZHANG, 2018; THAKUR; CHEN, 2019).

A penúltima reação da via de síntese do hormônio juvenil é a metilação do ácido farnesóico em metil farnesoato pela enzima FAMEt. Essa reação é dependente de SAM e altos níveis de SAH inibem a ação da FAMEt. Zhou et al. (2013) demonstraram em *Leptinotarsa decemlineata* que a inibição de SAHH por RNAi leva à queda nos níveis de transcritos do fator de transcrição Krüppel-like e nos títulos de hormônio juvenil, indicando que a degradação de SAH é essencial para a biossíntese desse hormônio.

O ácido láctico, outro metabólito pertencente ao Grupo 3, tem ação como HDACi. Altas concentrações de ácido láctico podem indicar alterações nos níveis de acetilação de histonas na amostra L3-3\_3 (LATHAM et al., 2012; TREFELY; DOAN; SNYDER, 2019).

Em larvas de *Melipona* não é possível identificar sexo ou casta. A partir do metabólico apresentado pela amostra L3-3\_3 é possível supor que essa amostra é de sexo ou casta diferente das demais amostras. O enriquecimento de funções



relacionadas à metilação de nucleotídeos, modificações pós-traducionais de histonas e síntese de hormônio juvenil permitem levantar a hipótese de que a mudança de perfil metabólico entre castas e sexo em *Melipona* é acompanhada por modificações epigenéticas e títulos distintos de hormônio juvenil.

A análise dos metabólitos com perfil de concentração diferente entre a amostra LD\_3 e as demais amostras do grupo não foi significativamente enriquecida para nenhuma função. Destacamos, ainda, destacar que entre os 329 metabólitos não foram identificados metabólitos diretamente relacionados ao metabolismo de geraniol ou 10HDA e também não foi identificado hormônio juvenil. No entanto, para identificação de hormônio juvenil por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa são necessárias etapas adicionais de pré-processamento da amostra, que não foram realizadas nesse trabalho, ou ionização química, enquanto, utilizamos ionização elétrica (LI et al., 2003; SPERLING et al., 2015; RAMIREZ et al., 2017).

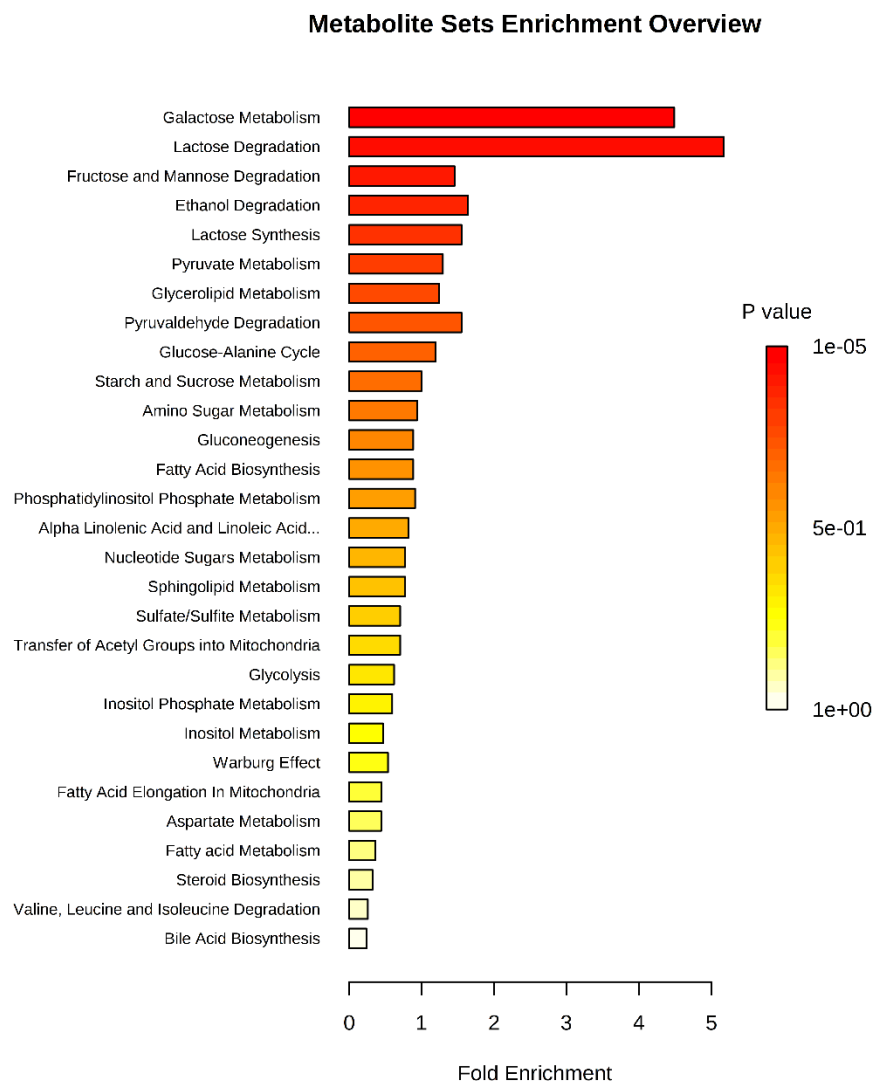
#### **4.4.2 Metabolômica de Alimentos**

O epigenoma é sensível a fatores nutricionais, especialmente durante as primeiras etapas do desenvolvimento de animais (MENTCH; LOCASALE, 2015; ZHANG, 2015). Em alguns casos, os efeitos na regulação da expressão gênica persistem mesmo depois da remoção do agente que desencadeou a modificação epigenética (TURNER, 2009).

No caso das abelhas *Apis mellifera*, o estímulo nutricional (geleia real) durante o período larval desencadeia reprogramação gênica e diferenciação em rainhas. Investigamos, por GC/MS, se o alimento de *Melipona scutellaris* contém algum dos metabólitos que desempenham papel na diferenciação de castas em outras espécies de abelhas.

A análise metabolômica de alimento larval identificou 380 metabólitos (Anexo II) e a análise de enriquecimento de funções indica enriquecimento significativo para metabólitos relacionados à degradação de lactose e ao metabolismo da galactose ( $P < 0.05$ ) (Figura 22). Esses resultados são esperados, uma vez alimento larval é a única fonte energética que a abelha dispõe para metabolizar desde a fase de ovo até a eclosão do imago e estão de acordo com os resultados

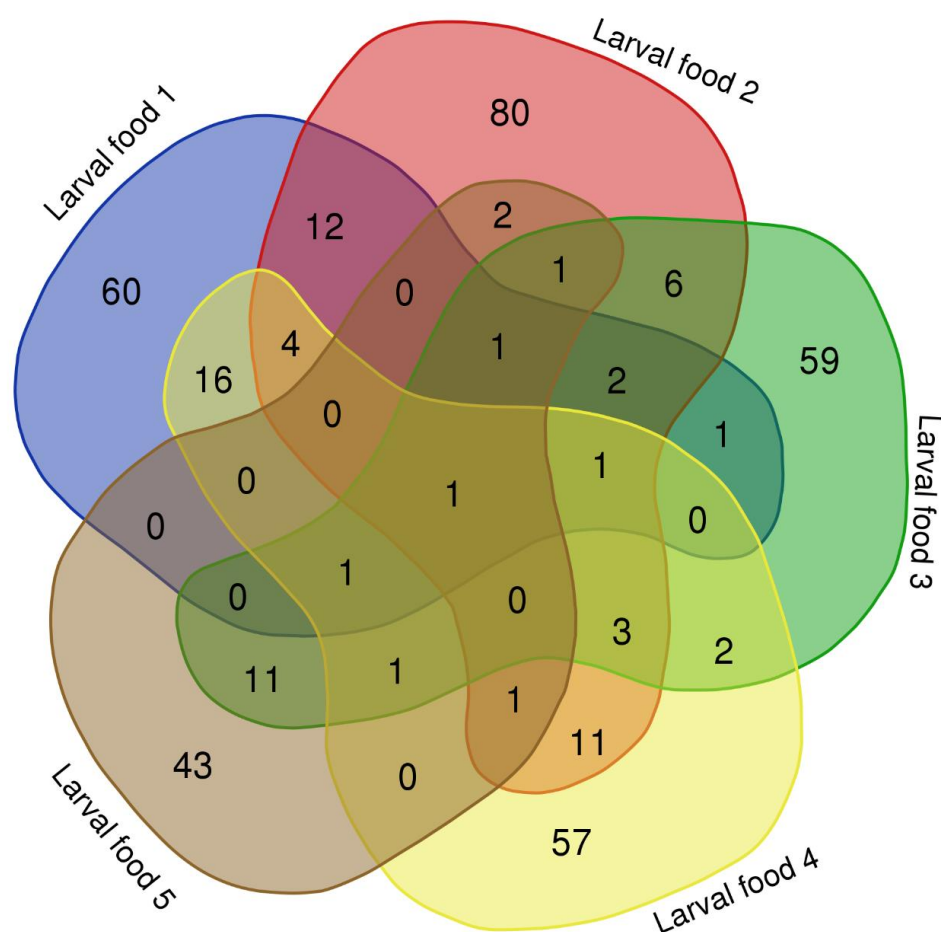
encontrados por Hartfelder; Engels (1989) em análise de alimento de *Melipona quadrifasciata*.



**Figura 22:** Análise de Enriquecimento dos metabólitos encontrados no alimento larval de *Melipona scutellaris*.

Surpreendentemente, diferentes amostras de alimento larval compartilharam poucos metabólitos (Figura 23), indicando grande diversidade de compostos identificados. Os metabólitos compartilhados por mais de duas amostras são relacionados ao metabolismo de carboidratos. Alimento larval de abelhas sem ferrão é rico em bactérias, leveduras e fungos, que fermentam o alimento e produzem uma ampla gama de metabólitos secundários (GILLIAM; ROUBI;

LORENZ, 1990). Nossa hipótese é a de que a diversidade de compostos pode ser resultado de níveis diferenciados de metabolização por diferentes microbiotas presentes em cada célula de cria.



**Figura 23:** Diagrama de Venn indicando o número de metabólitos compartilhados pelas amostras de alimento larval.

Destacamos, ainda, que entre os 380 metabólitos não foram identificados metabólitos diretamente relacionados ao metabolismo de geraniol, 10HDA e hormônio juvenil.

## 5 CONCLUSÃO

A partir da análise epigenética e metabólica da diferenciação de castas em *Melipona scutellaris* foi possível:

1. Identificar e quantificar, nos estágios de L2, L3-3 e LD, transcritos gênicos de *hdac1*, *hdac4* e *kat2*, correspondentes à maquinaria epigenética de acetilação e desacetilação, com diferença significativa de transcritos em L2 e L3-3;
2. Verificar que os níveis de transcritos de *hdac1* decrescem de L2 para L3-3, enquanto os de *kat2a* se elevam e que esse perfil é o mesmo dos transcritos de *mfe* e dos títulos de hormônio juvenil;
3. Em pupas de operária, houve diferença significativa nos níveis de transcrição dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a*, com indicação de relação com os títulos de ecdisteróides;
4. Pupas de rainha apresentaram diferença significativa de expressão para os transcritos dos genes *hdac1*, *hdac4* e *kat2a*;
5. A comparação de transcritos de *hdac1* e *hdac4* entre pupas de rainha e de operária mostrou diferença de perfil, sugerindo controle epigenético da acetilação/desacetilação de histonas na diferenciação de castas em *Melipona scutellaris*;
6. O Hormônio Juvenil III não foi eficiente para a indução de rainhas e, ainda, provocou alta taxa de mortalidade das larvas tratadas, atraso de desenvolvimento e alterações morfológicas nos imagos quando comparado com os resultados dos tratamentos dos grupos Controle;

7. O tratamento de larvas L3-3 e LPD com ácido 10-hidróxi-2E-decenóico (10HDA), um inibidor de desacetilase, não mostrou efeito na diferenciação de castas;
8. A análise metabolômica de larvas nos estágios de L2, L3-3 e LPD permitiu identificar 329 metabólitos, com enriquecimento para metabolismo de galactose e do ciclo da ureia. Nessas fases, nove dos metabólitos seguem o mesmo perfil de expressão dos transcritos dos genes *mfe*, *hdac1* e dos títulos de hormônio juvenil. Entre os 329 metabólitos não se identificou nenhum relacionado ao metabolismo de geraniol ou de 10HDA;
9. Pelo dendograma, foi possível verificar que uma única amostra de L3-3 (L3-3\_3) ficou em *cluster* isolado e apenas as amostras dessa fase apresentaram correlação muito baixa e até negativa;
10. O *heatmap* dos 100 metabólitos com maior diferença de concentração dividiu os compostos em 3 grupos: 1) de concentração elevada em L2; 2) de concentração elevada em LD e 3) de concentração elevada apenas na amostra L3-3\_3;
11. A análise de enriquecimento de funções de 52 metabólitos, com concentração elevada na amostra L3-3\_3 mostrou enriquecimento significativo para funções relacionadas ao metabolismo de aminoácidos e galactose. Esse resultado permite sugerir que essa amostra seja de sexo ou casta diferente das demais dessa fase;
12. O perfil metabólico de larvas pode ser indicador de casta/sexo e de alterações epigenéticas;
13. A metabolômica de alimento larval identificou 380 metabólitos e seu enriquecimento mostrou diferença significativa para metabolismo de lactose e galactose.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALI, I. et al. Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 3, p. 1216–1252, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00181>
- AMARAL, I. M. R. et al. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. **Micron**, v. 41, n. 2, p. 123–129, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.10.003>
- ARISTIZABAL, M. J. et al. Biological embedding of experience: A primer on epigenetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820838116>
- ARNEY, K. L.; FISHER, A. G. Epigenetic aspects of differentiation. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 4355–4363, 2004. <https://doi.org/10.1242/jcs.01390>
- ASFAHA, Y. et al. Recent advances in class IIa histone deacetylases research. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 115087, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115087>
- AUSIÓ, J. Histone variants - The structure behind the function. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 228–243, 2006. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ell020>
- BAKULSKI, K. M. et al. Alzheimer's disease and environmental exposure to lead: the epidemiologic evidence and potential role of epigenetics. **Current Alzheimer research**, v. 9, n. 5, p. 563–73, 2012. <https://doi.org/10.2174/156720512800617991>
- BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 70, 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-70>
- BARLOW, A L. et al. dSIR2 and dHDAC6: two novel, inhibitor-resistant deacetylases in *Drosophila melanogaster*. **Experimental Cell Research**, v. 265, n. 1, p. 90–103, 2001. <https://doi.org/10.1006/excr.2001.5162>
- BARNES, C. E.; ENGLISH, D. M.; COWLEY, S. M. Acetylation and Co: An expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. **Essays in Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 97–107, 2019. <https://doi.org/10.1042/EBC20180061>
- BEHURA, S. K.; WHITFIELD, C. W. Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. **Insect Molecular Biology**, v. 19, p. 431–439, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

BERGER, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 407–412, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05915>

BONASIO, R. et al. Genomic Comparison of the Ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. **Science**, v. 329, p. 1068–1071, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1192428>

BONASIO, R. et al. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. **Current Biology**, v. 22, n. 19, p. 1755–1764, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.042>

BONASIO, R. The role of chromatin and epigenetics in the polyphenisms of ant castes. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 3, p. 235–245, 2014. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt056>

BONETTI, A. M. **Ação do Hormônio Juvenil sobre a Expressão Gênica em *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação (Mestrado) — FMRP/USP. São Paulo. p. 140. 1982.

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

BONETTI, A. M. Efeitos do hormônio juvenil no desenvolvimento ovariano de *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 509-516, 1984.

BONETTI, A. M.; KERR, W. E. Sex determination in bees XX. Study of gene-action in *Melipona marginata* and *Melipona compressipes* based on morphometric analysis. **Revista Brasileira de Genética**, v. 8, n. 4, p.629-638, 1985.

BONETTI, A.M.; CRUZ-LANDIM, C. da; KERR, W.E. Sex determination in bees. XXX. Effects of Juvenile Hormone in development of tergal glands in *Melipona*. **Journal Apicultural Research**, v. 1, n. 33, p.11-14, 1994.

BONETTI, A. M.; KERR, W.E.; MATUSITA, S.H. Effects of Juvenile Hormone I, II and III in single and fractionated dosage in *Melipona* bees. **Revista Brasileira de Biologia**, v.1, n. 55, p.113- 120, 1995.

BRANCO, M. R.; FICZ, G.; REIK, W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 1, p. 7–13, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrg3080>

BRITO, D. V. et al. Molecular characterization of the gene feminizer in the stingless bee *Melipona interrupta* (Hymenoptera: Apidae) reveals association to

sex and caste development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, p. 24–30, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.09.008>

BURGERS, W. A.; FUKS, F.; KOUZARIDES, T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 6, p. 275–277, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02667-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02667-7)

CABRAL, G. de C. P. **Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) - uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos de hormônio juvenil**. Tese (Doutorado) - USP. Ribeirão Preto, p. 83. 2009.

CAMPOS, L. A. O.; VELTHUIS-KLUPPELL, F. M.; VELTHUIS, H. H. W. Juvenile hormone and caste determination in a stingless bee. Sex determination in bees. VII. **Naturwissenschaften**, 1975.

CAMPOS, L. A. O. Sex Determination in Bees . VI . Effect of a Juvenile Hormone Analogue in Males and Females of *Melipona Quadrifasciata* ( *Apidae* ) **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 51, n. 2, p. 228–234, 1978.

CAMPOS, L. A. O. Determinação do sexo nas abelhas. XIV. Papel do hormônio juvenil na diferenciação das castas na subfamília *Meliponinae* (*Hymenoptera*, *Apidae*). **Revista Brasileira de Biologia**, 1979.

CARDOSO-JÚNIOR, C. A. M. et al. Epigenetic modifications and their relation to caste and sex determination and adult division of labor in the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 68, p. 61–68, 2017a. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0242>

CARDOSO-JÚNIOR, C. A. M. et al. Methyl farnesoate epoxidase (mfe) gene expression and juvenile hormone titers in the life cycle of a highly eusocial stingless bee, *Melipona scutellaris*. **Journal of Insect Physiology**, v. 101, p. 185–194, 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.08.001>

CHITTKA, A.; CHITTKA, L. Epigenetics of royalty. **PLoS Biology**, v. 8, n. 11, p. 8–11, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000532>

CHODAPARAMBIL, J. V. et al. Nucleosome structure and function. **Ernst Schering Research Foundation Workshop**, n. 57, p. 29–46, 2006. [https://doi.org/10.1007/3-540-37633-X\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-37633-X_2)

COSGROVE, M. S.; WOLBERGER, C. How does the histone code work? **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire**, v. 83, p. 468–476, 2005. <https://doi.org/10.1139/o05-137>

CRUZ-LANDIM, C. da; HOFLING, M. C. A.; FONSECA, V. L. I.. Tergal and mandibular glands in queens of *Paratrigona subnuda* (Moure) (*Hymenoptera*:



*Apidae*). Morphology and associated behaviour. **Naturalia**, v. 5, n. 5, p.121-133, 1980.

DALLACQUA, R. P.; SIMÕES, Z. L. P.; BITONDI, M. M. G. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. **Insectes Sociaux**, v. 54, n. 1, p. 70–76, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00040-007-0913-1>

DE CARVALHO, W. J. et al. Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–22, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174857>

DE MORAIS, C. R. et al. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (*Apidae: Meliponini*). **Chemosphere**, v. 206, p. 632–642, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.153>

DE SOUSA, C. S. et al. Insights into the *Melipona scutellaris* (*Hymenoptera, Apidae, Meliponini*) fat body transcriptome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 292–297, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000200022>

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 93–100, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1084-9521\(02\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S1084-9521(02)00141-6)

DIAS, J.; BONETTI, A.; KERR, W. E. Determinação do número de instares larvais em *Melipona scutellaris* (*Hymenoptera: Apidae*). **Naturalia**, v. 26, p. 257-263, 2001.

DONG, Z.; BODE, A. M. The Role of Histone H3 Phosphorylation ( Ser10 and Ser28 ) in Cell Growth and Cell Transformation. **Molecular Carcinogenesis**, v. 421, p. 416–421, 2006. <https://doi.org/10.1002/mc.20220>

DORIGO, A. S. et al. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 223027, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213109>.

DUEÑAS-GONZÁLEZ, A. et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. **Molecular Cancer**, v. 4, p. 38, 2005. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-4-38>

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02625>

ERNST, U. R. et al. Epigenetics and locust life phase transitions. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. Pt 1, p. 88–99, 2015.

<https://doi.org/10.1242/jeb.107078>

FORET, S.; KUCHARSKI, R.; PELLEGRINI, M. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences of USA**, v. 109, n. 13, p. 4968–4973, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202392109>

FREITAS, F. C. P. et al. Evaluation of reference genes for gene expression analysis by real-time quantitative PCR (qPCR) in three stingless bee species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53544-0>

FUKS, F. et al. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. **Nature Genetics**, v. 1, n. 24, p.88-91, 2000. <https://doi.org/10.1038/71750>

GABOR MIKLOS, G. L.; MALESZKA, R. Epigenomic communication systems in humans and honey bees: From molecules to behavior. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 3, p. 399–406, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.05.016>

GALBRAITH, D. A.; YI, S. V; GROZINGER, C. M. Evaluation of Possible Proximate Mechanisms Underlying the Kinship Theory of Intragenomic Conflict in Social Insects. **Integrative and Comparative Biology**, v. 56, n. 6, p. 1206–1214, 2016. <https://doi.org/10.1093/icb/icw111>

GAN, Q. et al. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 1, p. 2–9, 2007. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0383>

GEORGE, S.; GADDELAPATI, S. C.; PALLI, S. R. Histone deacetylase 1 suppresses Krüppel homolog 1 gene expression and influences juvenile hormone action in *Tribolium castaneum* . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 36, p. 17759–17764, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909554116>

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4–13, 2010. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.54>

GILLIAM M.; ROUBIK D. W.; LORENZ B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**. v. 21, p.89–97, 1990. <https://doi.org/10.1051/apido:19900201>

GLASTAD, K. M.; HUNT, B. G.; GOODISMAN, M. A. D. Epigenetics in Insects: Genome Regulation and the Generation of Phenotypic Diversity. **Annual Review of Entomology**, v. 64, n. 1, p. 185–203, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111914>

GREENBERG, J. K. et al. Behavioral plasticity in honey bees is associated with differences in brain microRNA transcriptome. **Genes, Brain and Behavior**, p. 1–11, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00782.x>

GUIL, S.; ESTELLER, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 1, p. 87–95, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.005>

GOODMAN, W.G.; CUSSON, M.; The juvenile hormones. In: Gilbert, L.I. (Ed.) Insect Endocrinology. **Academic Press**, London, pp. 310–365. 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10008-1>

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: Evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insectes Sociaux**, v. 36, p.1-14, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF02225876>

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 40, p. 45–77, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60364-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60364-6)

HEARD, T. A. The Role of Stingless Bees in Crop Pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 183–206, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.183>

HERB, B. R. et al. Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 1371–1373, 2012. <https://doi.org/10.1038/nn.3218>

HOLMAN, L.; TRONTTI, K.; HELANTERÄ, H. Queen pheromones modulate DNA methyltransferase activity in bee and ant workers. **Biology Letters**, v. 12, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.1038>

HU, Y. et al. Histone deacetylase inhibitor treatment restores memory-related gene expression and learning ability in neonicotinoid-treated *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, v. 00, 2018. <https://doi.org/10.1111/imb.12390>

IGLESIAS GONZÁLEZ, T. et al. Reversed phase and cation exchange liquid chromatography with spectrophotometric and elemental/molecular mass spectrometric detection for S-adenosyl methionine/S-adenosyl homocysteine ratios as methylation index in cell cultures of ovarian cancer. **Journal of Chromatography A**, v. 1393, p. 89–95, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.028>

JARAU, S. et al. Workers Make the Queens in *Melipona* Bees: Identification of Geraniol as a Caste Determining Compound from Labial Glands of Nurse Bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 6, p. 565–569, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9793-3>

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 478–483, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10093>

KAROUTAS, A. et al. The NSL complex maintains nuclear architecture stability via lamin A/C acetylation. **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 1248–1260, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0397-z>

KERR, W. E. Estudos sobre o Gênero *Melipona*. **Anais da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”**, v. 5, p. 181–276, 1948.

KERR, W. E. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. **Genetics**, v. 35, n. 2, p. 143, 1950.

KERR, W. E.; NIELSEN, R. A. Evidences that genetically determined *melipona* queens can become workers. **Genetics**, v. 54, n. 3, p. 859–866, 1966.

KERR, W. E.; STORT, A. C.; MONTENEGRO, M. J. Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero *Melipona*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 1, n. 38, p.149-168, 1966.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Urucu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte: Editora Liber Liber, 1996.

KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Mensagem Doce**, v. 80, p. 45–60, 2001.

KOSAK, S. T.; GROUDINE, M. Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. **Genes and Development**, v. 18, n. 12, p. 1371–1384, 2004. <https://doi.org/10.1101/gad.1209304>.

KUCHARSKI, R. et al. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1827–1830, 2008. <https://doi.org/10.1126/science.1153069>

LATHAM, T. et al. Lactate , a product of glycolytic metabolism , inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 11, p. 4794–4803, 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gks066>

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews. Genetics**, v. 11, n. 3, p. 204–220, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>

LERCKER, G. et al. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. **Lipids**, v. 16, n. 12, p. 912–919, 1981. <https://doi.org/10.1007/BF02534997>

LI-BYARLAY, H. et al. RNA interference knockdown of DNA methyl-transferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences** , v. 110, n. 31, p. 12750–12755, 2013.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1310735110>

LI, H. et al. Targeting methionine cycle as a potential therapeutic strategy for immune disorders. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 9, p. 861-877, 2017. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1370454>

LI, Y. et al. Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* in vitro: Effect of farnesoic acid and *Aedes* allatotropin. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 11, p. 1825–1832, 2003. <https://doi.org/10.1242/jeb.00371>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOCHMANOV, G. et al. Different Modes of Action of Genetic and Chemical Downregulation of Histone Deacetylases with Respect to Plant Development and Histone Modifications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20205093>

LOCKETT, G. A. et al. Contrasting Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Reward and Aversive Olfactory Memories in the Honey Bee. **Insects**, p. 377–398, 2014. <https://doi.org/10.3390/insects5020377>

LOLI, D. **Termorregulação colonial e energética individual em abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tese (Doutorado) - USP. São Paulo, p. 229 2008.

LOOF, A. De et al. The mode of action of juvenile hormone and ecdysone : Towards an epi-endocrinological paradigm ? **General and Comparative Endocrinology**, v. 188, p. 35–45, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.004>

LORINCZ, M. C.; SCHUBELER, D.; GROUDINE, M. Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 23, p. 7913–7922, 2001. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.7913-7922.2001>

LOZOYA, O. A. et al. Mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) oxidation links the tricarboxylic acid (TCA) cycle with methionine metabolism and nuclear DNA methylation. **PLoS Biology**, v. 16, n. 4, p. 1–23, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005707>

LYKO, F. et al. The honey bee epigenomes: Differential methylation of brain DNA in queens and workers. **PLoS Biology**, v. 8, n. 11, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000506>

MAJO, F. De; CALORE, M. Chromatin remodelling and epigenetic state regulation by non-coding RNAs in the diseased heart. **Non-coding RNA**

**Research**, v. 3, n. 1, p. 20–28, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.02.003>

MAKERT, G. R.; PAXTON, R. J.; HARTFELDER, K. An optimized method for the generation of AFLP markers in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata*) reveals a high degree of intracolony genetic polymorphism. **Apidologie**, v. 37, n. 6, p. 687–698, 2006. <https://doi.org/10.1051/apido:2006043>

MENTCH, S. J.; LOCASALE, J. W. One-carbon metabolism and epigenetics : understanding the specificity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 91–98, 2015. <https://doi.org/10.1111/nyas.12956>

MENSAERT, K. et al. Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 3, p.155-170, 2013. <https://doi.org/10.1002/em.21841>

MICHENER, Charles D. **The Bees of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.

MITAKA, Y.; TASAKI, E.; NOZAKI, T. Transcriptomic analysis of epigenetic modification genes in the termite *Reticulitermes speratus*. **Insect Science**, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12640>

MORINE, Y. et al. Role of histone deacetylase expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Surgery**, v. 151, n. 3, p. 412–419, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.038>

NICHOLSON, T. B.; VELAND, N.; CHEN, T. **Chapter 3. Writers, Readers, and Erasers of Epigenetic Marks**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800206-3.00003-3>

NIEBORAK, A.; SCHNEIDER, R. Metabolic intermediates e Cellular messengers talking to chromatin modifiers. **Molecular Metabolism**, v. 14, p. 39–52, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.01.007>

OPACHALOEMPHAN, C. et al. Recent Advances in Behavioral (Epi)Genetics in Eusocial Insects. **Annual Review of Genetics**, v. 52, n. 1, p. 489–510, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024456>

PATALANO, S. et al. Shifting behaviour: Epigenetic reprogramming in eusocial insects. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 3, p. 367–373, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.02.005>

PINTO, L. Z. et al. Ecdysteroid titers in pupae of highly social bees relate to distinct modes of caste development. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 783–790, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00103-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00103-8)

PRUITT, K.. Molecular and Cellular Changes During Cancer Progression

Resulting from Genetic and Epigenetic Alterations. **Progress in Molecular Biology And Translational Science**, p. 3-47, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.001>

QUINA, A. S.; BUSCHBECK, M.; DI CROCE, L. Chromatin structure and epigenetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1563–1569, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.016>

RAMIREZ, C. E. et al. Fast, ultra-trace detection of juvenile hormone III from mosquitoes using mass spectrometry. **Talanta**, v. 159, p. 371-378, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.041>

RICHARD, G. et al. Epigenetics and insect polyphenism: mechanisms and climate change impacts. **Current Opinion in Insect Science**, v. 35, p. 138-145, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.06.013>

ROBERTS, S. P.; ELEKONICH, M. M. Effects of Flight on Gene Expression and Aging in the Honey Bee Brain and Flight Muscle. **Insects**, p. 9–30, 2013. <https://doi.org/10.3390/insects4010009>

ROBINSON, P. J. J. et al. 30 nm Chromatin Fibre Decompaction Requires both H4-K16 Acetylation and Linker Histone Eviction. **Journal of Molecular Biology**, p. 816–825, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.050>

ROCHA, M. P. et al. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). **Hereditas**, v. 136, p. 19–27, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2002.1360104.x>

ROSSINI, S. A. **Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos corpora allata de *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEP (Hymenoptera, Apidae)**. Dissertação (Mestrado) — UNESP. Rio Claro, p. 120. 1989.

ROY, A.; PALLI, S. R. Epigenetic modifications acetylation and deacetylation play important roles in juvenile hormone action. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5323-4>

SANTANA, F. A. et al. Differentially displayed expressed sequence tags in *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) development. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 1, p. 69–75, 2006.  
<https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000100008>

SANTOS, D. C. de J. Divisão de trabalho e sua relação com a dinâmica dos hidrocarbonetos cuticulares em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação (Mestrado) — USP. Ribeirão Preto. p. 63, 2013.

SCHUMANN, N. A. B. et al. Three-dimensional reconstruction of corpora allata nucleus reveals insights into epigenetic mechanisms of caste differentiation in *Melipona scutellaris* stingless bees. **Apidologie**, 2019.  
<https://doi.org/10.1007/s13592-019-00647-2>

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer.

**Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2009.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>

SHI, Y. Y. et al. Epigenetic modification of gene expression in honey bees by heterospecific gland secretions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043727>.

SHIELDS, E. J. et al. High-Quality Genome Assemblies Reveal Long Non-coding RNAs Expressed in Ant Brains. **Cell Reports**, v. 23, n. 10, p. 3078–3090, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.014>

SILVA, R. P. **Expressão de genes da via de biossíntese do Hormônio Juvenil em *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).**

Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) — Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 60. 2011.

SILVA, G. R. Da et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (*Apidae*, *Meliponini*), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 299–308, 2014.

<https://doi.org/10.1590/1808-1657000812012>

SIMOLA, D. F. et al. A chromatin link to caste identity in the carpenter ant *Camponotus floridanus*. **Genome Research**, v. 23, n. 3, p. 486–496, 2013.

<https://doi.org/10.1101/gr.148361.112>.

SIMOLA, D. F. et al. Epigenetic (re)programming of caste-specific behavior in the ant *Camponotus floridanus*. **Science**, v. 351, n. 6268, p. aac6633, 2016.

<https://doi.org/10.1126/science.aac6633>

SMITH, C. R. et al. Patterns of DNA Methylation in Development, Division of Labor and Hybridization in an Ant with Genetic Caste Determination. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. 1–9, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042433>

SPANNHOFF, A. et al. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. **EMBO Reports**, v. 12, n. 3, p. 238–43, 2011.

<https://doi.org/10.1038/embor.2011.9>

SPERLING, S. et al. Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography: Re-Discovery of a Rapid and Versatile Method for Clean-Up and Fractionation in Chemical Ecology. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, n. 6, p. 574–583, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0584-8>

SUGANUMA, T.; WORKMAN, J. L. Signals and Combinatorial Functions of Histone Modifications. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 473–499, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-175347>



SUMNER, S.; PEREBOOM, J. J. M.; JORDAN, W. C. Differential gene expression and phenotypic plasticity in behavioural castes of the primitively eusocial wasp, *Polistes canadensis*. **Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society**, v. 273, n. 1582, p. 19–26, 2006.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3291>

SZYF, M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 100, n. 1, p. 7–23, 2007.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm177>

THAKUR, C.; CHEN, F. Connections between metabolism and epigenetics in cancers. **Seminars in Cancer Biology**, v. 57, p. 52–58, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.006>

TREFELY, S.; DOAN, M. T.; SNYDER, N. W. Crosstalk between cellular metabolism and histone acetylation. **Methods in Enzymology**, v. 626, p. 1–21, 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.07.013>

TSANKOVA, N. et al. Epigenetic Regulation in Psychiatric Disorders. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355–367, 2007.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2132>

TURNER, B. M. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1534, p. 3403–3418, 2009.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0125>

UEIRA-VIEIRA, C. et al. 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**, v. 67, n. 2, p. 97–106, 2008.  
<https://doi.org/10.1002/arch.20224>

ULREY, C. L. et al. The impact of metabolism on DNA methylation. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. SPEC. ISS. 1, p. 139–147, 2005.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi100>

VAN VEEN, JOHAN, W. Cell provisioning and oviposition in *Melipona beecheii* (*Apidae, Meliponinae*), with a note on caste determination. **Apidologie**, v. 31, p. 411–419, 2000. <https://doi.org/10.1051/apido:2000131>

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian *Meliponinae*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9–10, p. 785–789, 2000. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-9-1018>

VELTHUIS, H. H. W.; ROELING, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology**

**of the Netherlands**, v. 12, p. 45–49, 2001.

VERDIN, E.; OTT, M. 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 258–264, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrm3931>

VIANA, J. L. et al. Genetic variability in *Melipona scutellaris* from Reconcavo, Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3444–3454, 2013. <http://dx.doi.org/10.4238/2013.September.10.1>

WALDSCHMIDT, A. M.; DE BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. A molecular marker distinguishes the subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 609–611, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000300019>

WANG, X. et al. Trichostatin A and vorinostat promote adipogenic differentiation through H3K9 acetylation and dimethylation. **Research in Veterinary Science**, v. 126, p. 207–212, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.09.002>

WEDD, L.; KUCHARSKI, R.; MALESZKA, R. Differentially methylated obligatory epialleles modulate context-dependent LAM gene expression in the honeybee *Apis mellifera*. **Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2016. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1107695>

YAN, H. et al. DNA Methylation in Social Insects: How Epigenetics Can Control Behavior and Longevity. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 435–452, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020803>

YE, F. et al. Targeting epigenetic machinery: Emerging novel allosteric inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 107406, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107406>

YUN, J. et al. Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 1–10, 2012. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00163>

ZHANG, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 144–151, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.09.002>

ZHANG, N. Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 11–16, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>

ZHOU, L. et al. RNA interference of a putative S-adenosyl- L-homocysteine hydrolase gene affects larval performance in *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 10, p. 1049–1056, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.08.002>

## ANEXO I - Metabólitos Identificados em Larvas de *Melipona scutellaris*

- |  |  |
|--|--|
| 1 - 1,2-Dipalmitin                       | 38 - 4-Aminomethylcyclohexane                              |
| 2 - 1,3-propanediol                      | carboxylic acid  |
| 3 - 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol 1 | 39 - 4-Androsten-4-ol-3,17-dione                           |
| 4 - 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol 2 | 40 - 4-Bromo-1-butanol                                     |
| 5 - 1,5-anhydro-D-sorbitol               | 41 - 4-hydroxyquinoline 1                                  |
| 6 - 1,6-anhydro-glucose                  | 42 - 4-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (kynurenic acid) |
| 7 - 10-Nonadecenoic acid                 | 43 - 5-aminovaleric acid 2                                 |
| 8 - 11-Methyloctadec-12-enoic acid       | 44 - 5-Ethyl-1H-indole-2,3-dione                           |
| 9 - 17a-Aza-D-homoandrostan-17-one       | 45 - 5-hydroxy-L-tryptophan 1                              |
| 10 - 1-Aminocyclopentanecarboxylic acid  | 46 - 5-Hydroxymethyl-2-furoic acid                         |
| 11 - 1-Cyclopropyl-1-methyl-ethylamine   | 47 - 5-Hydroxypipicolinic acid                             |
| 12 - 1-Monomyristin                      | 48 - 6-[12(Z)-Nonadecenyl]salicylic acid                   |
| 13 - 1-Monopalmitin                      | 49 - 9,10-Anthracenedione                                  |
| 14 - 1-Octadecanol                       | 50 - Acetamide   |
| 15 - 1-stearoyl-rac-glycerol             | 51 - Acetic acid   |
| 16 - 2,3-butanediol 2                    | 52 - Acetin  |
| 17 - 2,3-Diamino-2,3-Dimethylbutane      | 53 - Acetol 3  |
| 18 - 2,3-Dihydroxypropyl icosanoate      | 54 - Adenosine   |
| 19 - 2,5-Furandicarboxylic acid          | 55 - Adenosine-5-monophosphate 2                           |
| 20 - 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol    | 56 - Alanine   |
| 21 - 2-hydroxybutyric acid               | 57 - Allo-inositol   |
| 22 - 2-Hydroxyisocaproic acid            | 58 - Alpha ketoglutaric acid                               |
| 23 - 2-hydroxypyridine                   | 59 - Alpha tocopherol                                      |
| 24 - 2-Ketobutyric acid                  | 60 - Alpha-Linolenic acid                                  |
| 25 - 2-Keto-d-gluconic acid              | 61 - Aminomalonic acid                                     |
| 26 - 2-ketoisocaproic acid 2             | 62 - Anthraquinone   |
| 27 - 2-Keto-l-gluconic acid              | 63 - Apigenin  |
| 28 - 2-Palmitoylglycerol                 | 64 - Arabinofuranose                                       |
| 29 - 2-Propanol                          | 65 - Arabino-hexaric acid                                  |
| 30 - 2-propenoic acid                    | 66 - Arachidic acid  |
| 31 - 2-Pyrrolidinone                     | 67 - Aspartic acid 1                                       |
| 32 - 3-Aminoisobutyric acid              | 68 - Aspartic acid 2                                       |
| 33 - 3-Bromo-1-propanol                  | 69 - Benzoic acid  |
| 34 - 3-Deoxyhexonic acid                 | 70 - Beta- alanine 1                                       |
| 35 - 3-hydroxypyridine                   | 71 - Beta-Alanine  |
| 36 - 3-phosphoglyceric acid              | 72 - Beta-Amyrin   |
| 37 - 3-Quinuclidinyl benzilate           | 73 - Beta-gentiobiose 1                                    |
|  | 74 - Beta-gentiobiose 2                                    |
|  | 75 - Beta-glycerolphosphate                                |
|  | 76 - Beta-sitosterol                                       |
|  | 77 - Butanoic acid   |
|  | 78 - Butantriol  |
|  | 79 - Cadaverine  |

80 - Campesterol	129 - D-Psicofuranose
81 - Cellobiose 1	130 - D-ribose-5-phosphate 2
82 - Cellobiose 2	131 - D-saccharic acid
83 - Cellotetraose	132 - D-sorbitol
84 - Citraconic acid	133 - D-threitol
85 - Citric acid	134 - Eicosane
86 - Citrulline 1	135 - Eicosapentaenoic acid
87 - Citrulline 2	136 - Elaidic acid
88 - Cyclolanost-24-en-3-ol	137 - Ergost-5-ene-3,25-diol
89 - Cytosine 2	138 - Ethanol
90 - D (+) galactose 1	139 - Ethanolamine
91 - D (+)altrose 1	140 - Etoxidine
92 - D (+)altrose 2	141 - Fructose 1
93 - D-(-)-Ribofuranose	142 - Fumaric acid
94 - D-(-)-Tagatofuranose	143 - Galactinol 2
95 - D-(+) trehalose	144 - Galactitol
96 - D-(+)-Galactose	145 - Galactonic acid 2
97 - D-(+)-Mannose	146 - Gallocatechin
98 - D-(+)-Talofuranose 1	147 - Gamma-aminobutyric acid
99 - D-(+)-Talofuranose 2	(GABA)
100 - D-(+)-Trehalose	148 - Ginkgolic acid 17:1
101 - D-allose 1	149 - Gluconic acid 1
102 - Dehydroascorbic acid	150 - Gluconic acid 2
103 - Dehydroascorbic acid 3	151 - Gluconic acid lactone 2
104 - Dehydroascorbic acid 4	152 - Glucopyranose
105 - D-Fructose	153 - Glucuronolactone 2
106 - D-Fucitol	154 - Glyceric acid
107 - D-Glucopyranose	155 - Glycerol
108 - D-glucose 1	156 - Glycerol 1-phosphate
109 - D-glucose 2	157 - Glyceryl-glycoside
110 - D-glucose-6-phosphate 1	158 - Glycine
111 - D-glucose-6-phosphate 2	159 - Glycolic acid
112 - Digalacturonic acid 1	160 - Glycyl-L-tyrosine 2
113 - Digalacturonic acid 3	161 - Glycylproline
114 - Dioctyl phthalate	162 - Glyoxylic acid
115 - DL-3-aminoisobutyric acid 1	163 - Guanosine 2
116 - DL-3-aminoisobutyric acid 2	164 - Guanosine-5'-monophosphate
117 - DL-isoleucine 1	165 - Heptadecanoic acid
118 - DL-isoleucine 2	166 - Heptanedioic acid
119 - D-lyxose 1	167 - Hexadecane-1
120 - D-lyxose 2	168 - Hexadecylamine
121 - D-malic acid	169 - Inosine
122 - D-mannitol	170 - Isomaltose 1
123 - D-Mannose	171 - Isomaltose 2
124 - D-mannose 2	172 - Isopropyl beta-D-1-
125 - D-Myo-Inositol	thiogalactopyranoside
126 - Dopamine	173 - Kestose
127 - D-Pinitol	174 - L- sorbose 1
128 - d-Proline	175 - L- sorbose 2

176 - L-(+) lactic acid	225 - L-tryptophan 2
177 - L-3-Methoxytyrosine	226 - L-tyrosine 1
178 - L-5-Oxoproline	227 - L-tyrosine 2
179 - Lactamide 2	228 - L-valine 1
180 - Lactitol	229 - L-valine 2
181 - Lactobionic acid 2	230 - Malonic acid 1
182 - Lactose 1	231 - Maltitol
183 - Lactulose 1	232 - Maltose 2
184 - L-Alanine	233 - Maltose 1
185 - L-alanine 1	234 - Maltotriitol
186 - L-alanine 2	235 - Maltotriose 1
187 - L-Asparagine	236 - Melibiose 1
188 - L-asparagine 2	237 - Melibiose 2
189 - L-cysteine 2	238 - Methoxyamine
190 - L-glutamic acid 1	239 - Methyl-alpha-Lyxofuranoside
191 - L-glutamic acid 2	240 - Methyl-beta-D-
192 - L-glutamic acid 3 (dehydrated)	galactopyranoside
193 - L-Glutamine	241 - Methyltartronic acid
194 - L-glutamine 1	242 - Monolaurin
195 - L-glutamine 2	243 - M-toluic acid
196 - L-glutamine 3	244 - Mucic acid
197 - L-histidine 3	245 - Myo-inositol
198 - L-homoserine 2	246 - Myricetin
199 - Linoleic acid	247 - Myristic acid
200 - Linolool oxide	248 - N-(2-
201 - L-kynurenine 1	hydroxyethyl)iminodiacetic acid
202 - L-kynurenine 2	249 - N,N-Dimethylglycine
203 - l-Leucine	250 - N-acetamide
204 - L-leucine 1	251 - N-acetyl-D-mannosamine 1
205 - L-leucine 2	252 - N-acetyl-L-histidine 2
206 - L-Lysine	253 - N-acetyl-ornithine 2
207 - L-lysine 1	254 - N-alpha-Acetyl-L-Lysine
208 - L-lysine 2	255 - N-Ethyldiethanolamine
209 - L-methionine 1	256 - N-ethylglycine 1
210 - L-methionine 2	257 - N-hydroxyproline
211 - L-methionine sulfoxide 1	258 - Nicotinic acid
212 - L-methionine sulfoxide 3	259 - N-methylalanine
213 - l-Norleucine	260 - Oleic acid
214 - L-norleucine 2	261 - O-phosphocolamine
215 - L-ornithine 1	262 - Oxalic acid
216 - L-ornithine 2	263 - Palatinitol
217 - L-Phenylalanine	264 - Palatinitol 1
218 - L-proline 1	265 - Palatinose
219 - L-proline 2	266 - Palmitic acid
220 - L-Ribulose	267 - Pantothenic acid 2
221 - L-serine 1	268 - Pentadecanoic acid
222 - L-serine 2	269 - Pentanedioic acid
223 - L-threonine 1	270 - Phenol
224 - L-threonine 2	271 - Phenylalanine

272 - Phenylalanine 1	302 - Taxifolin
273 - Phenyl-beta-glucopyranoside	303 - Tetrahydrofuran
274 - Phosphine	304 - Threonic acid
275 - Phosphoric acid	305 - Thymine
276 - Phosphorylethanolamine	306 - Trans,trans-muconic acid
277 - Pipecolic acid 1	307 - trans-1,4-
278 - Pipecolic acid 2	Cyclohexanedicarboxylic acid
279 - Prunetin	308 - Trans-13-octadecenoic acid
280 - Psicose 1	309 - Trans-3-hydroxy-L-proline
281 - Psicose 2	310 - Trans-4-hydroxy-L-proline 1
282 - Putrescine	311 - Trans-4-hydroxy-L-proline 2
283 - Pyroglutamic acid	312 - Trans-aconitic acid
284 - Pyrrole, 2-methyl-5-phenyl-	313 - Trehalose-6-phosphate
285 - Pyruvic acid	314 - Trigonelline
286 - Quinic acid	315 - Tromethamine
287 - Raffinose	316 - Turanose 1
288 - Ribitol	317 - Tyramine
289 - Sebacic acid	318 - Tyrosine 1
290 - Sophorose 1	319 - Tyrosine 2
291 - Sophorose 2	320 - Uracil
292 - Spermidine 1	321 - Urea
293 - Spermidine 2	322 - Uric acid 1
294 - Stearic acid	323 - Uridine
295 - Stigmasterol	324 - Uridine 5'-monophosphate 1
296 - Succinic acid	325 - Uridine 5'-monophosphate 2
297 - Sucrose	326 - Xanthine
298 - Syringetin	327 - Xanthotoxin 2
299 - Tagatose 1	328 - Xylitol
300 - Tagatose 2	329 - Xylulose
301 - Tartronic acid	

**ANEXO II - Metabólitos Identificados em Alimento Larval de *Melipona*  
*scutellaris***

- 1 - (1,2-Diphenylethylidene)amino benzoate
- 2 - (2-Butoxyethoxy)acetic Acid
- 3 - (2-Methylbenzo(b)thien-3-yl)acetamide
- 4 - (2R\*,3R\*)-1,2,3-Butanetriol
- 5 - (3S,9aR)-3-Butyloctahydro-1H-pyrrolo[1,2-a]azepine
- 6 - (5R,8R)-8-Methyl-5-pentyloctahydroindolizine
- 7 - (Benzo(b)thien-6-yl)acetic acid
- 8 - [2-(2-Ethoxyethoxy)ethoxy]acetic acid
- 9 - 1 monostearin
- 10 - 1-(1-tert-Butoxypropan-2-yloxy)propan-2-ol
- 11 - 1-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-ethoxycarbonyl-5-(4-methoxyphenyl)-pyrrole
- 12 - 1-(Butoxy(methoxy)methoxy)butane
- 13 - 1,11-Dodecadiene
- 14 - 1,1-Dicyanoethane
- 15 - 1,2,3-Propanetriol, 1-acetate
- 16 - 1,2,4-Triazole, 3-mercapto-4-phenyl-5-methyl
- 17 - 1,2,4-Triazolo[4,3-a]pyridine, 3,5-dimethyl
- 18 - 1,2-Benzenediol, o-(4-ethylbenzoyl)-o'-(3-methylbenzoyl)
- 19 - 1,2-Benzenediol, o-(4-methoxybenzoyl)-o'-(2,2,3,3,4,4,4-heptafluorobutyryl)
- 20 - 1,2-Ethanediamine, N-(2-aminoethyl)
- 21 - 1,2-Ethenediol, monoacetate
- 22 - 1,2-Ethenediol
- 23 - 1,3,5-Trioxane
- 24 - 1,3-Butanediol
- 25 - 1,3-Diamino-2-propanol
- 26 - 1,3-Dioxolane
- 27 - 1,3-Dioxolane, 2-(2,4-dimethylphenyl)-2,4,5-trimethyl-, (2.alpha.,4.alpha.,5.beta.)
- 28 - 1,3-Dioxolane, 2-(dichloromethyl)
- 29 - 1,3-Dioxolane-4-methanol, 2,2-dimethyl-, acetate
- 30 - 1,3-Hexadien-5-yne
- 31 - 1,4:3,6-Dianhydro-alpha-d-glucopyranose
- 32 - 1,4-Piperazinedicarbonitrile
- 33 - 1,5,7-Octatrien-3-ol, 3,7-dimethyl
- 34 - 1,5-Anhydro-d-mannitol
- 35 - 1,5-Anhydrohexitol
- 36 - 1,5-Cyclooctadiene, 1-ethyl
- 37 - 1,5-Pentanediol, O,O'-divaleryl
- 38 - 1,6,11-Dodecatriene, (Z)
- 39 - 1,6-Octadiene, 3,7-dimethyl
- 40 - 1,9-Decadiyne
- 41 - 1-Buten-3-yne
- 42 - 1-Butoxy-2-propanol
- 43 - 1-Deoxypentitol
- 44 - 1-Ethyl-2-propyl-pyrazolium bromide

45 - 1-Fluorooctane  
46 - 1H-Azepine, hexahydro-1-nitroso  
47 - 1-Heptadecanol  
48 - 1-Hexyne, 6-(1-ethoxyethoxy)  
49 - 1H-Indene, 1-hexadecyl-2,3-dihydro  
50 - 1H-Indole-3-acetamide, 2-methyl-.alpha.-oxo  
51 - 1H-Indole-3-acetic acid, 5-hydroxy  
52 - 1H-Pyrazole, 1-methyl-4-methylaminomethyl  
53 - 1H-Pyrrole-3,4-dicarbonitrile  
54 - 1-Monopalmitin  
55 - 1-Propanol, 2-ethoxy  
56 - 1-Propoxy-2-propanol  
57 - 1-stearoyl-rac-glycerol  
58 - 2(1H)-Pyridinone, 6-hydroxy  
59 - 2,3-Butanediol  
60 - 2,3-dihydroxybiphenyl  
61 - 2,4,6-Cycloheptatrien-1-one  
62 - 2,4-Diamino-5-nitropyrimidine  
63 - 2,4-Di-tert-butylphenol  
64 - 2,4-Pentadienenitrile  
65 - 2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2-hydroxy-5-methyl  
66 - 2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, dioxime  
67 - 2,5-Octadiyne, 4,4-diethyl  
68 - 2,6-Difluoro-3-methylbenzamide, N-(3-chloro-4-fluorophenyl)  
69 - 2,6-Dimethylbenzaldehyde  
70 - 2-.alpha.-Mannobiose (isomer 1)  
71 - 2-Amino-3-hydroxy-5-nitropyridine  
72 - 2-Benzylquinoline  
73 - 2-Butanol  
74 - 2-Butanol, 1,4-dichloro  
75 - 2-Buten-1-one, 3-amino-1-phenyl  
76 - 2-Butoxyethyl acetate  
77 - 2-Chloroethylamine  
78 - 2-Deoxypentofuranose  
79 - 2-Ethyl-3-methoxypyrazine  
80 - 2-Ethylthiolane, S,S-dioxide  
81 - 2-Furaldehyde dimethyl hydrazone  
82 - 2H-1,5-Benzodioxepin, 3,4-dihydro-3-methylene  
83 - 2-Hydrazinopyridine  
84 - 2-Isopropyl-3-ketobutyrate  
85 - 2-Ketohexanoic acid  
86 - 2-Methyl-4H,6H-thieno[3,4-c]pyrazol-3-amine  
87 - 2-Methyliminoperhydro-1,3-oxazine  
88 - 2-Octene, 1-(methoxymethoxy)-, (E)  
89 - 2-Pentanol  
90 - 2-Pentylfuran  
91 - 2-Phenyl-1,3-oxazol-2-ine  
92 - 2-Propanol, 1,3-dichloro  
93 - 2-Propenamide, N-(1,1-dimethylethyl)-3-phenyl



94 - 2-Propynenitrile, 3-fluoro  
95 - 2-Pyridinecarboxylic acid  
96 - 2-Pyrrolidinone, 4,4-dimethyl-5-methylidene  
97 - 2-Thiazolidinecarboxylic acid  
98 - 2-Thio-2,4-oxazolidinedione  
99 - 3-(2-Hydroxyethyl)indole, N,O-bis(heptafluorobutyryl)  
100 - 3,3-Dimethylhexane  
101 - 3,5-Methano-2H-cyclopenta[b]furan-2-one, 3,3a,4,5,6,6a-hexahydro-7-syn-(hydroxymethyl)-, (3R,3a-trans,5-cis,6a-trans)  
102 - 3-.alpha.-Mannobiose (isomer 2)  
103 - 3-[2-(Prop-2-en-1-yloxy)phenyl]prop-2-enamide  
104 - 3-Buten-2-amine, N,N-diethyl  
105 - 3-Buten-2-ol  
106 - 3-Chloropyrazine 1-oxide  
107 - 3-Cyano-5,5-dimethoxycarbonyl-N-methylisoxazolidine  
108 - 3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 2,4,6-trimethyl  
109 - 3H-Pyrazol-3-one, 2-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-2,4-dihydro-5-methyl-4-(3-methylbutyl)  
110 - 3-Hydroxy-2-p-tolyl-2-butenenitrile  
111 - 3-Hydroxypicolinamide  
112 - 3-Methoxy-N,O-bis(pentafluoropropionoyl)tyrosine, methyl ester  
113 - 3-Methyl-2-butanol  
114 - 3-Methylbenzothiophene  
115 - 3-Methylbenzyl alcohol, methyl ether  
116 - 3-Methylbutyl N,N'-bis(heptafluorobutyryl)tryptophanate  
117 - 3-Nitro-1H-pyrazole-4-carbonitrile  
118 - 3-Octadecanone  
119 - 3-Oxa-bicyclo[3.2.0]hept-6-ene-2,4-dione  
120 - 3-Phenylpropionic acid, 2-naphthyl ester  
121 - 3-Pyridinol  
122 - 3-Pyrrolidinecarboxylic acid, 5-oxo-1-(2-pyridinylmethyl)  
123 - 3-Quinolinecarboxylic acid, 6-fluoro-4-hydroxy-, ethyl ester  
124 - 3-Tetradecen-5-yne, (E)  
125 - 3-Undecyne  
126 - 4(1H)-Pyrimidinone, 2,3-dihydro-5-methyl-2-thioxo  
127 - 4(1H)-Pyrimidinone, 2-ethyl-6-methyl  
128 - 4-(Allylthio)-2-(4-methoxyphenyl)quinazoline  
129 - 4-Amino-1-oxo-1,2-dihydrophthalazine  
130 - 4-Decyne  
131 - 4-Fluoro-6-methoxy-2-phenylaminopyrimidine  
132 - 4-Heptanone, oxime  
133 - 4-Hexen-2-one  
134 - 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl  
135 - 4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl  
136 - 4-Methoxy-4-methyl-2-pentanol  
137 - 4-Methylbenzyl alcohol, methyl ether  
138 - 4-Phenoxy-5,6-diphenyl-2H-pyridazin-3-one  
139 - 4-Tridecyne  
140 - 4-Trifluoromethylbenzoic acid

141 - 5,10-Pentadecadien-1-ol, (Z,Z)  
 142 - 5.alpha.-Androstan-16-one, cyclic ethylene mercaptole  
 143 - 5-Chloro-2-oxo-benzooxazole-3-carboxylic acid cyclohexylamide  
 144 - 5-endo-(Hydroxymethyl)-6-exo-methylbicyclo[2.2.1]hept-2-ene  
 145 - 5H-[1,4]Oxazino[2,3,4-ij]quinolin-3(2H)-one, 6,7-dihydro  
 146 - 5H-Pyrrolo[1,2-a]azepine-1-carbonitrile, 2-amino-6,7,8,9-tetrahydro-3-(4-methoxybenzoyl)  
 147 - 5-Hydroxymethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxane  
 148 - 5-Thio-D-glucose  
 149 - 6H-Cyclobuta[jk]phenanthrene  
 150 - 6-Methoxy-3-methyl-2-benzofurancarbaldehyde  
 151 - 6-Phenylisoquinoline  
 152 - 7,7-Dimethyl-3,6,8,11-tetraoxa-7-silatridecane  
 153 - 7-Tetradecen-1-ol, (Z)  
 154 - 8,11,14-Eicosatrienoic acid, (Z,Z,Z)  
 155 - 8-Dodecen-1-ol, acetate, (Z)  
 156 - 9-(2-p-Tolyloethyl)-3,4,5,6,7,9-hexahydro-2H-xanthene-1,8-dione  
 157 - 9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)  
 158 - 9H-Xanthen-9-one, 3-hydroxy  
 159 - 9-Oxabicyclo[3.3.1]nona-2-ene, 6-acethylthio  
 160 - Acetaldehyde, chloro  
 161 - Acetamide, 2,2,2-trifluoro-N-methyl  
 162 - Acetamide, 2-chloro  
 163 - Acetic acid  
 164 - Acetic acid, (3-methyl-2-nitrophenyl)methyl ester  
 165 - Acetic acid, (acetyloxy)  
 166 - Alanine, N-methyl-n-butoxycarbonyl-, octyl ester  
 167 - alpha-Hydroxyisobutyric acid, trifluoroacetate  
 168 - Alpha-Ketoisovaleric acid  
 169 - Alpha-Linolenic acid  
 170 - Aniline, 2-(3-methoxy-1-propynyl)  
 171 - Arabinofuranose  
 172 - Benzaldehyde, 4-(dimethylamino)  
 173 - Benzamide, O-[(phenylamino)carbonyl]oxime  
 174 - Benzenamine, 2,5-dimethoxy  
 175 - Benzenamine, 3-methoxy-N-(4-pyridinylmethylene)  
 176 - Benzene, (1-bromo-3-iodopropyl)  
 177 - Benzene, (2-nitropropen-1-yl)  
 178 - Benzene, 1,2-dimethoxy  
 179 - Benzene, 1-methyl-2-(methylthio)  
 180 - Benzeneacetic acid, .alpha.-(acetyloxy)-.alpha.-methyl-, methyl ester  
 181 - Benzeneethanamine, N-methyl-3-nitro-N-(2-phenylethyl)  
 182 - Benzeneethanol, 4-(acetyloxy)  
 183 - Benzimidazo[2,1-a]isoquinoline  
 184 - Benzo(b)thiophene-3-acetamide  
 185 - Benzoic acid, 4-(acetyloxy)-3-methoxy-, methyl ester  
 186 - Benzoic acid, 4-ethoxy-, ethyl ester  
 187 - beta-D-(+)-Xylopyranose  
 188 - beta-D-Galactofuranose

189 - Beta-D-Galactopyranoside, acetate  
190 - beta-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro  
191 - beta-gentiobiose 1  
192 - beta-gentiobiose 2  
193 - beta-Hydroxypyruvic acid  
194 - Beta-L-Arabinopyranoside, methyl  
195 - Bicyclo[3.3.0]oct-1(5)-ene  
196 - Bicyclo[4.1.0]heptane, 7-methylene  
197 - Bis(2-chloroethyl) ether  
198 - Bis(2-Hydroxyethylthio)methane  
199 - Butoxyacetic acid  
200 - Carbamic acid, 4-fluorophenyl-, methyl ester  
201 - Carbamimidoylsulfanylacetic acid  
202 - Carbonochloridic acid, chloromethyl ester  
203 - Cellobiose  
204 - cis-1,4-Cyclohexanediol  
205 - Cyclopentaneundecanoic acid  
206 - Cyclopropane, 1,1'-methylenebis  
207 - Cyclopropanecarboxamide, N-n-propyl  
208 - D-(-)-Lactic acid  
209 - D-(-)-Ribofuranose (isomer 1)  
210 - D-(+)-Cellobiose (isomer 2)  
211 - D-(+)-Glucuronic acid .gamma.-lactone  
212 - D-(+)-Turanose  
213 - D-(+)-Xylose (anti)  
214 - D-(+)-Xylose (isomer 1)  
215 - D-allose  
216 - D-Allose, oxime (isomer 1)  
217 - D-Erythro-Pentopyranose  
218 - D-Fructose  
219 - D-Galactonic acid, .gamma.-lactone  
220 - D-Galactose  
221 - d-Glucohexodialdose  
222 - D-Glucose  
223 - D-Glucurono-6,3-lactone  
224 - Diacetin  
225 - Dianhydromannitol  
226 - Diglycerol  
227 - Dihydrocarvyl acetate  
228 - Diisopropyl azodicarboxylate  
229 - Dimethyl carbonate  
230 - Dimethyltryptamine  
231 - D-Lactic acid  
232 - DL-Valine  
233 - D-Lyxose  
234 - D-Maltose  
235 - D-Mannitol  
236 - d-Mannose  
237 - d-Ribo-hexos-3-ulose

238 - D-sorbitol  
239 - D-threitol  
240 - E-1,5,9-Decatriene  
241 - Enflurane  
242 - Ephedrine  
243 - Ethane, 1,1,2,2-tetramethoxy  
244 - Ethane, 1,1-diethoxy  
245 - Ethane, 2-chloro-1,1-dimethoxy  
246 - Ethanediarnide  
247 - Ethanefulfonyl chloride, 2-chloro  
248 - ethanol  
249 - Ethanol, 2-(2-hydroxyethoxy)-, 1-nitrate  
250 - Ethoxyacetic acid  
251 - Ethyl .alpha.-D-glucopyranofide  
252 - Ethyl orthoformate  
253 - Ethylene glycol  
254 - Formaldehyde, methyl(2-propenyl)hydrazone  
255 - Formamide, N,N-dimethyl  
256 - Formazan, 3,4-dihydro-1-ethyl-3,3,5,5-tetramethyl  
257 - Fructose  
258 - Fumaric acid, 2-fluorophenyl pentyl ester  
259 - Fumaric acid, ethyl 3-methylbut-2-en-1-yl ester  
260 - Furan-2-carboxylic acid, [2-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-ylcarbamoyl)ethyl]amide  
261 - Galactinol  
262 - Galactitol  
263 - galactofamine  
264 - Gephyrotoxin 181b  
265 - Gluconic acid, .gamma.-lactone  
266 - Glycerol  
267 - Glycolic acid  
268 - Glycolic acid, acetate  
269 - Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester  
270 - Hexadecanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester  
271 - Hexadecanoic acid, 4-nitrophenyl ester  
272 - Hexanoic acid, 3-butenyl ester  
273 - Hydroxyurea, N,N',O-trimethyl  
274 - Isomaltose  
275 - Isophthalic acid, butyl 2-methylprop-2-en-1-yl ester  
276 - Isophthalic acid, di(1-isopropyl-2-methylpropyl) ester  
277 - Isoquinoline-3-carboxylic acid, 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-, hydrazide  
278 - Isoxazole  
279 - Isoxazole, 3,5-dimethyl  
280 - L-(+)-Lactic acid  
281 - L-(+)-Lactic acid  
282 - L-(+)-Threose  
283 - Lactic Acid  
284 - lactitol  
285 - lactobionic acid

286 - lactose  
287 - Lactulose  
288 - Lactulose (isomer 1)  
289 - L-Arabitol  
290 - Leucrose  
291 - Levoglucosenone  
292 - L-Lactic acid  
293 - L-Norleucine  
294 - Maleic hydrazide  
295 - Maltitol  
296 - Maltose (isomer 2)  
297 - Melibiose  
298 - Methanamine, N-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)methyl  
299 - Methane, chloromethoxy  
300 - Methane, tribromofluoro  
301 - Methanesulfonylacetonitrile  
302 - methanone, bis(phenylsulfonyl)-, 2-phenylhydrazone  
303 - Methazolamide  
304 - Methyl .alpha.-D-glucofuranoside  
305 - Methyl 1-methylpyrrole-2-carboxylate  
306 - Methyl 2,2-dimethyl-3,6,9-trioxa-2-silaundecan-11-oate  
307 - Methyl 2-[2-(4-chlorophenyl)-5-methyl-1H-imidazol-1-yl]dithiobenzoate  
308 - Methyl 2-malonate  
309 - Methyl 3,3-dimethoxypropionate  
310 - Methyl 3-hydroxybutyrate  
311 - Methyl 5,7-nonadiynoate  
312 - Methyl alpha-Arabinofuranoside  
313 - Methyl alpha-Lyxofuranoside  
314 - Methyl galactoside  
315 - Methyl galactoside (1S,2R,3S,4R,5R)  
316 - Methyl hydrogen disulfide  
317 - Methyl isoleucinate  
318 - Methylthiouracil  
319 - Myo-Inositol  
320 - n-Hexadecanoic acid  
321 - N-Methoxy-N-methylacetamide  
322 - N-Methylaurotetanine  
323 - N-Phenyl-N'-(4-hydroxybenzylidene) hydrazine  
324 - n-Propyl acetate  
325 - N-Trifluoromethylsulfanilformamide  
326 - Octadecane-1,2-diol  
327 - Octadecanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester  
328 - Oxalic acid  
329 - Oxazolidine  
330 - Palatinitol  
331 - Palatinose  
332 - Palmitic acid  
333 - Pentanal, 5-(methylenecyclopropyl)  
334 - Pentane, 3-chloro-3-methyl

335 - Pentane, 3-methoxy  
336 - Pentane-1,1-diol diacetate  
337 - Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)  
338 - Phenol, 3-methoxy-2-methyl  
339 - Phosphorochloridic acid, dipentyl ester  
340 - Phthalic acid, hexadecyl 2-(pentafluorophenoxy)ethyl ester  
341 - Phthalylglycyl hydrazide  
342 - Piperidine, 2-methyl-1-(1-phenylethyl)  
343 - Piperidine-4-carboxylic acid, 1-carboxymethyl  
344 - Pregnane-3,20-diol, (3.alpha.,5.beta.,20S)  
345 - propan-1-ol  
346 - Propanal  
347 - Propane(dithioic) acid, ethyl ester  
348 - Propanedinitrile, (acetyloxy)methyl  
349 - Propanenitrile, 3-hydroxy  
350 - Propanethial, S-oxide  
351 - Propanoic acid, 2,2-dimethyl-, 2-ethylhexyl ester  
352 - Propanoic acid, chloro-2-hydroxy  
353 - Propanoic acid, dimethyl  
354 - Propanoic acid, ethyl ester  
355 - Propiolonitrile  
356 - Propyl nitrite  
357 - Propylene glycol  
358 - Pyridine  
359 - Pyridine, 4-methoxy-1-oxide  
360 - Pyridinium, 1-(2-hydrazino-2-oxoethyl)-, chloride  
361 - quino[2,3-b]acridine-7,14-dione, 5,12-dihydro-5,12-dimethyl  
362 - Rhamnose  
363 - Ribitol  
364 - Ribonolactone  
365 - Scyllo-Inositol  
366 - Sedoheptulose  
367 - Semioxamazide  
368 - Sophorose  
369 - Sorbitol  
370 - Spiro[2.4]heptane, 4-methylene  
371 - s-Triazolo[4,3-a]pyrazine, 3-ethyl-8-methyl  
372 - Succinic acid, dodec-2-en-1-yl 2-methoxy-5-methylphenyl ester  
373 - Terephthalic acid, cyclobutyl decyl ester  
374 - Tetrahydro-1,3-oxazine-2-thione  
375 - Thiazolidine-2,5-dione  
376 - Trichloromonofluoromethane  
377 - Tricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-3-ene, 4-ethyl  
378 - Triethylene glycol  
379 - Turanose  
380 - Zipeprol

