

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

LARISSA FERNANDA QUINTINO

**Busca e compreensão de mecanismos biológicos através de análises *in silico*
do transcriptoma de *Apis mellifera***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2021

LARISSA FERNANDA QUINTINO

**BUSCA E COMPREENSÃO DE MECANISMOS BIOLÓGICOS ATRAVÉS DE
ANÁLISES *IN SILICO* DO TRANSCRIPTOMA DE *APIS MELLIFERA***

Search and understanding of biological mechanisms through *in silico* analysis of the *Apis mellifera* transcriptome

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Michele Potrich.

Coorientador: Henrique Moura Dias.

DOIS VIZINHOS

2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

LARISSA FERNANDA QUINTINO

**BUSCA E COMPREENSÃO DE MECANISMOS BIOLÓGICOS ATRAVÉS DE
ANÁLISES *IN SILICO* DO TRANSCRIPTOMA DE *APIS MELLIFERA***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito do título de Bacharel
em nome do Curso de Zootecnia da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus
Dois Vizinhos

Data de aprovação: 13/12/2021

Michele Potrich
Titulação (Doutorado)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Fabiana Martins Costa Maia
Titulação (Doutorado)
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Marcelo Marques Zerillo
Titulação (Doutorado)
Universidade de São Paulo

**DOIS VIZINHOS
2021**

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais por todo o apoio, força e dedicação a mim.

Minha avó e meu avô que sempre me apoiaram em todas as escolhas.

À minha orientadora pela confiança depositada.

Ao meu coorientador por me ajudar, aconselhar e me proporcionar esta experiência em um mundo que antes não conhecia.

Sou grata a todos os professores que me proporcionaram um ensino de qualidade, uma bagagem de conhecimento e conselhos que levarei para toda vida.

Ademais, agradeço todos os outros envolvidos que acrescentaram para minha jornada acadêmica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeito dos Agrotóxicos sobre a Reprodução (Rainha e Zangão) e a Produção de Geleia Real	16
Figura 2 - As Interações Entre as Abelhas, Fatores Abióticos e Bióticos, em Conjunto com a Genética de cada Indivíduo Interfere na Expressão do Fenótipo	18
Figura 3 - Divisão dos RNAs não Codificantes de Acordo com o seu Tamanho e Funcionalidade.....	19
Figura 4 - Tipos de LncRNAs Descritos na Literatura.....	21
Figura 5 – LncRNA Disposto em Cis (A) e Trans (B).....	22
Figura 6 – Interações e Mecanismos de LncRNAs	23
Figura 7 – Número de Sequências Depositadas nos Bancos de Dados WGS e NCBI Genbank	25
Figura 8 – Fluxo de Análise de Transcriptoma com Base em Algumas Ferramentas	30
Figura 9 - Fluxo de Análise de RNA-seq com Base em Três Tecnologias de Sequenciamento	33
Figura 10 – Tecnologias de Sequenciamento Utilizadas em Bioinformática	36
Figura 11 - Pipeline para Análises de LncRNAs em Amostras de Transcriptoma de <i>A. mellifera</i>	38
Figura 12 – Demonstração da Qualidade das Leituras de SRR8297881 pelo Gráfico <i>Per Base Sequence</i> : O Eixo X Representa a Posição dos Reads e o Eixo Y a Pontuações de Qualidade. Com as Seguintes Cores no Eixo Y – Verde (Leituras com Boa qualidade), Laranja (Leituras com Qualidade Razoável) e Vermelho (Leituras com Baixa Qualidade)	42
Figura 13 – Heatmap do Perfil de Expressão de mRNAs entre o Grupo Controle, Cipermetrina 0,3 ng (CiperZT) e Cipermetrina 3 ng (CiperT). Transcritos filtrados a partir do FDR < 5% com Valores de Expressão por logFC: <i>log Fold Change</i> (logFC), sendo a cor azul representa os RNAs regulados negativamente e em vermelho RNAs regulados positivamente.....	45
Figura 14 – Rede de Co-Expressão de interação de mRNAs e LncRNAs do Tratamento de Cipermetrina 3 ng a partir do log2FC > 0.9 e p-value ajustado ≤ 0.01	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Banco de Dados Disponíveis na Web	27
Tabela 2 - Plataformas que Fornecem Pipelines para o Uso em Bioinformática	28
Tabela 3 - Plataformas que Fornecem Pipelines para o Uso em Bioinformática	29
Tabela 4 - Softwares Utilizados para as Etapas de Análises de RNA-seq	35
Tabela 5 – Número de Leituras e % de Alinhamentos das Amostras	43
Tabela 6 – O nível de Correlação dos lncRNAs e seus Alvos: Dados Gerados a partir do Pacote EBseq e psych Conforme os Parâmetros de $\log_2FC > 0.9$ e p-value ajustado ≤ 0.01.	47
Tabela 7 – Análise de Enriquecimento Funcional com KEGG e Gene Ontology do Processo Biológico dos Transcritos do Grupo de Cipermetrina 3 ng com base nos IDs .	49
Tabela 8 – Localização Subcelular de lncRNAs Diferencialmente Expressos (FDR < 0.05) Correlacionados a Genes ($\log_2FC > 0.9$ e p-value ajustado ≤ 0.01).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP – Capeamento
cDNA – DNA Complementar
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ENCODE – *Encyclopedia of DNA Elements*
FDR – *False Discovery Rate*
FM – Ferragina-Manzini
RNA – Ácido Ribonucleico
mRNA – RNA Mensageiro
lncRNA – RNA Longo Não Codificante
GenBank – Banco de Dados Público do *National Center for Biology Information*
GFF – *General Feature Format*
KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
EMDB – *Electron Microscopy Data Bank*
lincRNA – RNA Longo não Codificante Intergênico
logFC - *log Fold Change*
ncRNA – RNA Não Codificante
miRNA – MicroRNA
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NGS – *Next Generation Sequencing*
P450 – Monooxigenases do Citocromo P450
Pb – Par de Bases
piRNA - RNA de Interação com Piwir
RNA – RNA Ribossômico
SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*
SRA – *Sequence Read Archive*
tRNA – RNA Transportador
WGS – *Whole Genome Shotgun Sequencing*
GO – *Gene Ontology*

RESUMO

QUINTINO, Larissa Fernanda. **Busca e compreensão de mecanismos biológicos através de análises *in silico* do transcriptoma de *Apis mellifera***. 2021. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2021.

As abelhas são excelentes agentes polinizadores e produtoras de mel, geleia real, apitoxina e própolis. Nos últimos anos, a sua atividade vem sendo afetada devido ao uso exacerbado de agrotóxicos em áreas de plantio comercial. Com base nisso, as análises do efeito genético e ambiental, bem como a interação entre esses dois fatores, poderão contribuir com o entendimento sob as alterações fenotípicas causadas pelo uso de agrotóxico. Embora o efeito ambiental seja um fator limitante a ser mensurado, estudos de transcriptoma poderão auxiliar nos programas de melhoramento. No entanto, apesar desses insetos serem considerados organismo-modelo para diversos campos da ciência, muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que regem a biologia desses insetos. A nível molecular, os lncRNAs estão ganhando destaque devido ao seu envolvimento na expressão epigenética até mesmo transcricionais e traducionais. Devido à grande importância dessas moléculas, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar e avaliar potenciais lncRNAs envolvidos no sistema biológico da abelha. Foi selecionado o conjunto de dados de abelhas expostas à cipermetrina (cipermetrina 0,3 ng/abelha e cipermetrina 3 ng/abelha), a fim de fazer as análises de transcriptoma por meio de métodos computacionais. Para isso, foi realizada a análise de controle de qualidade das amostras (FastQC e Trim Galore!), mapeamento das sequências (Hisat2) contra o genoma de referência Amel_HAV3.1, por seguinte a quantificação (Htseq-count) a partir da anotação do conjunto de RNAs de *Apis mellifera*. Para a expressão diferencial dos RNAs entre as amostras, foi utilizado o software EdgeR. Posteriormente foi feito a normalização das sequências e análise de rede de co-expressão para identificar a interação dos transcritos (mRNA e lncRNA) utilizando o Cytoscape e respectivamente foi analisada as funções das moléculas de lncRNA a partir da ferramenta ClueGO. Os transcritos correlacionados foram submetidos a análise preditiva de localização subcelular pelo iLoc-LncRNA. Dessa forma, foi observado ao todo 21 lncRNAs diferencialmente expressos em cipermetrina (3 ng), enquanto 2 lncRNAs foram diferencialmente expressos em cipermetrina de menor dosagem (0,3 ng). Parte desses lncRNAs diferencialmente expresso em cipermetrina 3 ng estão correlacionados com mRNAs, em vias como formação dorsoventral axial e processo catabólico de mRNAs. Além disso, conforme a análise da localização subcelular dos lncRNAs, observou-se que grande parte dessas moléculas estão situados no núcleo e citoplasma. Os resultados demonstram possível envolvimento dessas moléculas a nível transcricional. Diante disso, apesar de haver indícios da atuação dessas moléculas, ainda são necessários mais estudos para compreender a biologia das abelhas, principalmente no que tange ao efeito de agrotóxicos.

Palavras-chave: Agrotóxico; Regulação Gênica; Genômica Funcional; Epigenética; lncRNA.

ABSTRACT

QUINTINO, Larissa Fernanda. **Search and understanding of biological mechanisms through *in silico* analysis of the *Apis mellifera* transcriptome.** 2021. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

Honey bees are excellent pollinating agents and producers of honey, royal jelly, apitoxins and propolis. In recent years, its activity has been affected due to the exacerbated use of pesticides in commercial plantation areas. Based on this, the analysis of genetic and environmental effects, as well as an interaction between these two factors, contribute to the understanding of how phenotypic changes caused by the use of pesticides. Although the environmental effect is a limiting factor to be measured, transcriptome studies can help in breeding programs. However, despite these insects being considered model organisms for several fields of science, very little is known about the molecular mechanisms that govern the biology of these insects. At the molecular level, lncRNAs are gaining prominence due to their involvement in epigenetic expression, even transcriptional and translational. Due to the great importance of these molecules, this work aims to characterize and evaluate potential lncRNAs involved in the biological system of the bee. The data set of bees exposed to cypermethrin (cypermethrin 0.3 ng/bee and cypermethrin 3 ng/bee) was selected to carry out the transcriptome analyzes using computational methods. For this, the quality control analysis of the samples (FastQC and Trim Galore!), mapping of the sequences (Hisat2) against the reference genome Amel_HAv3.1 was carried out, then the quantification (Htseq-count) was performed from the annotation of the *Apis mellifera* RNA set. For the differential expression of RNAs between samples, the EdgeR software was used. Afterwards, normalization of the sequences and analysis of the co-expression network were carried out to identify the interaction of transcripts (mRNA and lncRNA) using Cytoscape and, respectively, the functions of lncRNA molecules were analyzed using the ClueGO tool. The correlated transcripts were submitted to predictive analysis of subcellular localization by iLoc-LncRNA. Thus, a total of 21 lncRNAs differentially expressed in cypermethrin (3 ng) were observed, while 2 lncRNAs were differentially expressed in lower dose cypermethrin (0.3 ng). Part of these lncRNAs differentially expressed in cypermethrin 3 ng are correlated with mRNAs, in pathways such as dorsoventral axial formation and mRNA catabolic process. Furthermore, according to the analysis of the subcellular localization of lncRNAs, it was observed that most of these molecules are in the nucleus and cytoplasm. The results demonstrate a possible involvement of these molecules at the transcriptional level. Therefore, although there is evidence of the action of these molecules, further studies are needed to understand the biology of honey bees, especially regarding the effect of pesticides.

Keywords: Pesticide; Genetic Regulation; Functional Genomics; Epigenetics; lncRNA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos.....	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	A Importância das Abelhas e o Impacto do Uso de Agrotóxicos	14
3.2	Apicultura no Brasil e seus Desdobramentos	17
3.3	O Universo de ncRNAs (RNAs Não Codificantes)	18
3.3.1	LncRNA (RNAs Longos Não Codificantes) e seu Proeminente Papel na Biologia	20
3.4	Bioinformática para Leigos: A Interpretação Além de <i>Scripts</i>	24
3.4.1	RNA-Seq: A Revolução da Tecnologia de RNA	31
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	Varredura em Bancos de Dados Públicos e <i>Dataset</i> de RNA-Seq.....	39
4.2	Plataforma e Controle de Qualidade	40
4.3	Mapeamento de Sequências do RNA-Seq no Genoma.....	40
4.4	Contagem de <i>Reads</i> Mapeados em LncRNAs e mRNAs.....	40
4.5	Análise de Expressão Diferencial	41
4.6	Análise de Co-Expressão e Enriquecimento de Vias Funcionais	41
4.7	Predição de Localização Subcelular	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Controle de qualidade de dados de RNAseq	42

5.2	Análise de Expressão Diferencial	43
5.3	Análise da Rede de Co-Expressão e Enriquecimento de Via	46
5.4	Localização Subcelular dos LncRNAs Diferencialmente Expressos	49
6	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A polinização realizada pelas abelhas, é de grande importância para a propagação da biodiversidade de diferentes espécies vegetais (JUDD *et al.*, 2009). Cerca de 94% de plantas angiospermas distribuídas pelo planeta necessitam da polinização realizada por animais (SLUIJS; VAAGE, 2016). Na agricultura, esse número corresponde a 75% das culturas cultivadas (KLEIN *et al.*, 2006). As abelhas não contribuem apenas com a polinização, mas também com a produção de o mel, geleia real, própolis e apitoxina que são usados para a saúde e alimentação humana (CAMARGO, 2002). Mesmo com a relevância das abelhas no âmbito ecológico e produtivo, nas últimas décadas as abelhas entraram em declínio devido a diferentes fatores, dentre estes o uso de agrotóxico no campo (COX-FOSTER *et al.*, 2007; POTTS *et al.*, 2010; GOULSON *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015; CALATAYUD-VERNICH *et al.*, 2018).

Um dos principais fatores para a sobrevivência da colônia é a nutrição (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010; SCHMEHL *et al.*, 2014). A nutrição não está apenas ligada à saúde, mas à diferenciação e desenvolvimento das castas. Isso ocorre ainda no período inicial de vida quando alimentadas com geleia real (HAYDAK, 1970; KAMAKURA, 2011). A contribuição da alimentação, nutrição e outros fatores externos e internos permite com que a colmeia viva em sintonia, onde cada casta tem uma função definida (HAYDAK, 1970; ROBINSON, 1992; TOTH; ROBINSON, 2005; AMENT *et al.*, 2008). Entre os fatores que cooperam na harmonia entre esses indivíduos, é a habilidade de comunicar-se com outras abelhas (VON FRISCH; LINDAUER, 1956), tal como memorizar (MENZEL, 2001) e aprender (GIURFA *et al.*, 2001). Por conta dessa organização, as abelhas são consideradas organismos-modelo para estudos comportamentais, funcionais e evolutivos (WANG *et al.*, 2018).

Mesmo sendo um excelente organismo modelo, muitas informações de mecanismos moleculares ainda são pouco elucidadas (BLOCH; GROZINGER, 2011). A partir disso, pesquisadores têm buscado conhecimento sobre a interação e a contribuição de moléculas como RNAs não codificantes (ncRNAs) (GUO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017).

Apesar dos ncRNAs terem sido negligenciados, atualmente já se sabe que essas moléculas atuam em muitos mecanismos que regem os processos biológicos (KNOWLING; MORRIS, 2011; BOLAND, 2017). Em insetos eussociais como as abelhas, essas moléculas estão associadas à diferenciação das castas (ASHBY *et al.*, 2016), memória (CRISTINO *et al.*, 2014) e mudanças comportamentais (BEHURA; WHITFIELD, 2010). Ainda dentro da classe de ncRNAs, um grupo que está ganhando destaque são os lncRNAs (RNAs não codificantes longos) (FU, 2014).

Os lncRNAs possuem semelhanças estruturais com os mRNAs (RNAs mensageiros) (ULITSKY; BARTEL, 2013) e a sua alta dinâmica molecular, permite atuar em todos os níveis de expressão gênica (epigenético, transcricional e traducional) (ZHANG *et al.*, 2019). Por meio disso, os lncRNAs conseguem desempenhar diferentes funções moleculares (LV *et al.*, 2019) como em resposta à patógenos (OUYANG *et al.*, 2014), câncer (SCHMITT; CHANG, 2016) e silenciamento gênico (SANTORO *et al.*, 2013). Embora os lncRNAs tenham grande importância nos processos biológicos, pouco se sabe ainda a função dessas moléculas em abelhas. Até o momento existem 1.858 lncRNAs de *A. mellifera* anotados depositados no banco de dados *Ensembl* (WALLBERG *et al.*, 2019), mas apenas seis foram caracterizados funcionalmente e validados (WU *et al.*, 2016).

Em virtude da falta de informações das funções dos lncRNAs, muitas questões podem ser levantadas: Essas moléculas influenciam na fisiologia das abelhas? Atuam na regulação de alguma via metabólica? Os lncRNAs são expressos quando as abelhas são expostas ao agrotóxico? Em que mecanismos moleculares atuam?

Com base nesses questionamentos, o presente trabalho visa a integração da bioinformática para avaliar as possíveis vias de atuação de lncRNAs em características intrínsecas a fisiologia e a preservação da saúde de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Prever a função e a relação de RNAs longos não codificantes (lncRNAs) no transcriptoma de *Apis mellifera carnica* exposta a cipermetrina em duas concentrações (0,3 ng e 3 ng).

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar lncRNAs diferencialmente expressos no transcriptoma de *A. mellifera* exposta a cipermetrina.
- Compreender a contribuição de lncRNAs de *A. mellifera*.
- Analisar a função dos lncRNAs e possíveis vias de atuação relacionados a genes codificantes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Importância das Abelhas e o Impacto do Uso de Agrotóxicos

Mais da metade das plantações do Brasil dependem da polinização realizada pelas abelhas (GIANNINI *et al.*, 2015), além disso, contribuem para a economia brasileira como o mel, própolis, geleia real e a cera (CAMARGO, 2002). Em 2020 a exportação de mel movimentou mais de US\$77 milhões (ABEMEL, 2020). No entanto, nos últimos anos houve o aumento da mortalidade desses insetos no Brasil e em outras regiões do mundo (A STEINHAEUER *et al.*, 2014; PORRINI *et al.*, 2016; CERQUEIRA; FIGUEIREDO, 2017). A exposição aos agrotóxicos tem sido relacionada como uma das principais causas da morte das abelhas (A STEINHAEUER *et al.*, 2014; PORRINI *et al.*, 2016; CERQUEIRA; FIGUEIREDO, 2017).

Grande parte da produção agrícola é frequentemente exposta a agrotóxicos para controle de pragas (GALLO *et al.*, 2002). Essas substâncias agem de forma com que impossibilite o organismo de executar algum mecanismo biológico essencial (BAIRD; CANN, 2011). Por consequência, evita a sua proliferação e os danos que estes podem causar às plantações (BAIRD; CANN, 2011). Há uma infinidade de agrotóxicos que se diferenciam quanto à composição, modo de ação e ao organismo alvo (BAIRD; CANN, 2011). Essas substâncias podem ser classificadas como inseticidas (controle de insetos), acaricidas (controle de ácaros), herbicidas (controle de plantas), bactericida (controle de bactérias), fungicida (controle de fungos), tal como outros tipos para controle de aves, algas, cupins e lesmas (GALLO *et al.*, 2002; BAIRD; CANN, 2011).

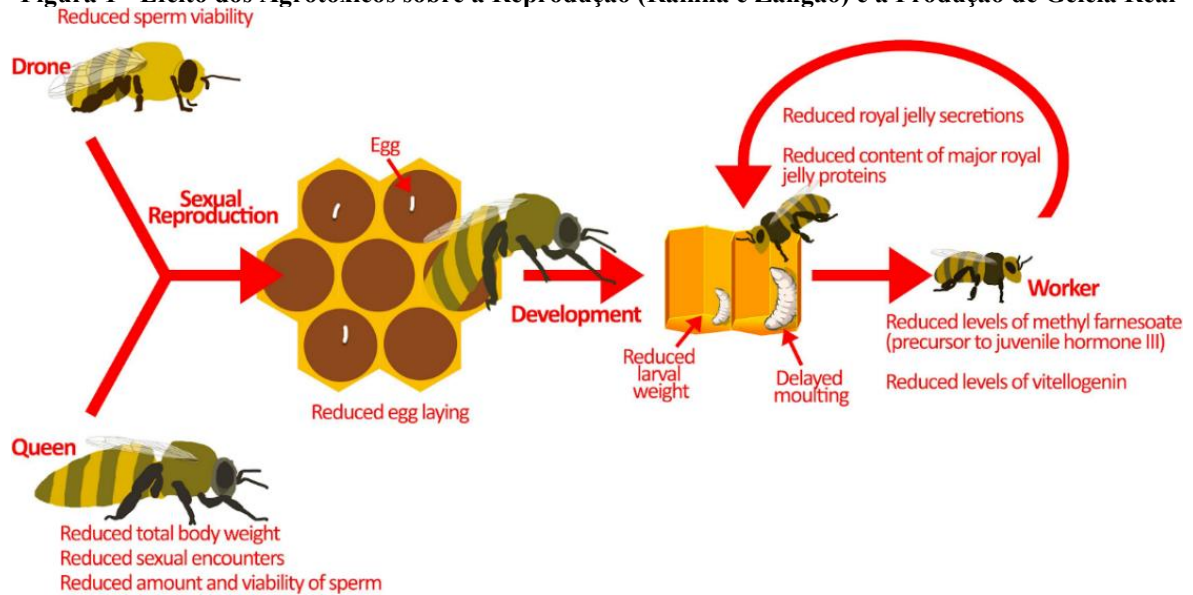
O Brasil está na lista dos países que mais utilizam agrotóxicos na lavoura, somente entre o ano de 2000 e 2014 houve um aumento significativo de 135% no consumo (CARNEIRO *et al.*, 2015; BOMBARDI, 2017). No ano subsequente, em 2015, foram mobilizados mais de 800 milhões de litros distribuídos em 71 milhões de hectares destinados ao cultivo (PIGNATI *et al.*, 2017). Embora tenham benefícios para a agricultura, esses produtos podem permanecer por anos no ambiente e englobam compostos ativos com toxicidade de leve à alta que comprometem a saúde dos seres humanos (PIGNATI *et al.*, 2017), recursos naturais (MELO *et al.*, 2010), tal como outros organismos importantes para o ecossistema (CONNOLLY, 2013).

Os herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, assim como a mistura entre essas substâncias têm potencial de toxicidade e podem comprometer a saúde e a biologia da abelha (JOHNSON *et al.*, 2013; DEGRANDI-HOFFMAN; CHEN; SIMONDS, 2013; SANDROCK *et al.*, 2013; MATTOS; SOARES; TARPY, 2017; FARINA *et al.*, 2019). Esses produtos podem

ser transportados à colmeia de diferentes fontes e vias. Dentro das formas, a contaminação pode ser através da inalação ou por meio da ingestão de água e alimentos contaminados (KRUPKE *et al.*, 2012; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014; SGOLASTRA *et al.*, 2018). Também podem se contaminar pelo tegumento quando em contato com superfícies (plantas, cera, solo ou poeira) a qual há a presença de resíduos de agrotóxico (SGOLASTRA *et al.*, 2018). Desse modo, a forma como é feita a aplicação de agrotóxico, também pode influenciar na exposição das abelhas ao ambiente (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Outras considerações a serem feitas são as particularidades dos componentes, a quantidade, o tempo de exposição do organismo ao produto e a assimilação metabólica, pois determinará o efeito do produto sobre o organismo (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014).

Atualmente, têm sido realizados diversos estudos para avaliar os efeitos deletérios dos agrotóxicos sobre a biologia das abelhas. A memória (WILLIAMSON; WRIGHT, 2013) e o sistema motor (WILLIAMSON *et al.*, 2013), bem como a sobrevivência (DOUBLET *et al.*, 2014), estão entre as características que são afetadas pelo uso indiscriminado dessas substâncias. Os agrotóxicos também podem interferir na microbiota e acometer a saúde imune das abelhas, muitas dessas substâncias podem enfraquecer a atividade imunológica facilitando a ataque de patógenos como o ácaro *Varroa* e o fungo *Nosema* (VIDAU *et al.*, 2011; TESOVNIK *et al.*, 2017; ROUZÉ *et al.*, 2019; CHMIEL *et al.*, 2020). Outras implicações podem surgir como a redução na quantidade e qualidade do alimento larval produzido pelas abelhas nutrizas devido à má formação das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017; WU *et al.*, 2017), comprometendo o desenvolvimento larval (Figura 1) (CHMIEL *et al.*, 2020).

Figura 1 - Efeito dos Agrotóxicos sobre a Reprodução (Rainha e Zangão) e a Produção de Geleia Real



Fonte: CHMIEL *et al.* (2020).

Outras análises realizadas apontam que rainhas expostas a agrotóxicos, têm redução da resistência a doenças (BRANDT *et al.*, 2017) e, principalmente, problemas na reprodução. Provocadas pelas anormalidades decorrentes da exposição a essas substâncias, tais como a menor quantidade de esperma armazenado na espermateca, tamanho do ovário (WILLIAMS *et al.*, 2015) e a redução do peso corporal (GAJGER; SAKAČ; GREGORC, 2017). Fisher e Rangel (2018) identificaram que zangões quando expostos a mistura entre o fungicida Clorotalonil e o inseticida Clorpirifós, tiveram redução de 16% da viabilidade dos espermatozoides quando comparado ao grupo controle (Figura 1).

À nível molecular, o efeito do agrotóxico sob esses insetos tem potencial para desestabilizar os processos biológicos como a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento (DERECKA *et al.*, 2013). Mesmo com a exposição a esses agentes, as abelhas têm mecanismos que permitem tolerar tais substâncias (GONG; DIAO, 2016). Um exemplo disso, são as enzimas do citocromo P450 que atuam na via de desintoxicação das abelhas (FEYEREISEN, 2005; GONG; DIAO, 2016).

Além disso, outras moléculas podem influenciar positivamente na desintoxicação e resistência a agrotóxicos. Estudos realizados com *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas ou mariposa), identificou que lncRNAs (RNAs longos não codificantes) podem estar atuando na resistência à inseticidas (ETEBARI; FURLONG; ASGARI, 2015; ZHU *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017). As análises do potencial dessas moléculas, abre novas oportunidades para desenvolvimento de estratégias para mitigar a ação dos agrotóxicos em insetos (ETEBARI; FURLONG; ASGARI, 2015; ZHU *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017), principalmente os mais

utilizados no Brasil que acometem a saúde das abelhas. No entanto, é importante ter o conhecimento da biologia da abelha e a interação dessas moléculas para avaliar a eficiência de tais estratégias e como poderão atuar no organismo.

3.2 Apicultura no Brasil e seus Desdobramentos

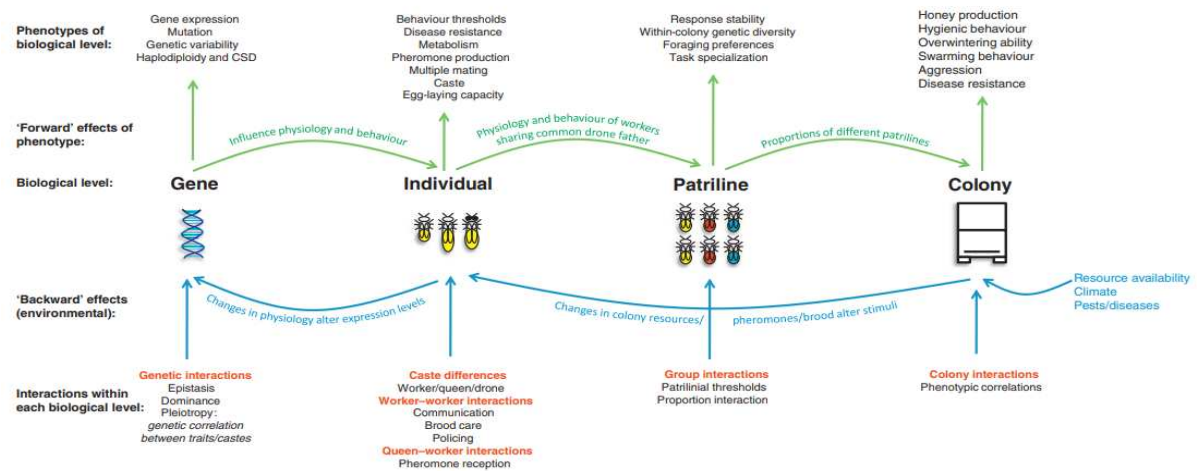
O mercado apícola brasileiro é potencialmente vasto, devido à dimensão territorial e diversificação, bem como à robustez presente na flora, de forma a fornecer nichos para o crescimento do setor, sendo uma alternativa para pequenos e médios produtores (SOUZA *et al.*, 2007; ARRUDA, 2013; HANEL, 2016). Posto que o produto apícola mais explorado é o mel, algumas atividades adicionais como a produção de geleia real têm demonstrado crescimento no mercado brasileiro (TEIXEIRA, 2007; SOUZA *et al.*, 2007; ARRUDA, 2013; HANEL, 2016; NIE *et al.*, 2017). A produção de geleia real no Brasil ainda é considerada baixa, no entanto vale ressaltar que os dados inerentes a produção de geleia real na apicultura brasileira ainda são vagos, necessitando de mais estudos (SOUZA *et al.*, 2007; OLIVEIRA JUNIOR; CALVÃO, 2019).

A carência de novas tecnologias e práticas de manejo disponíveis no Brasil reflete em uma baixa produção dos produtos apícolas (SANTOS *et al.*, 2018). Métodos mais eficientes de manejo em consórcio com o melhoramento genético abrem uma perspectiva fundamental para uma maior exploração da produção de produtos apícolas, principalmente de mel no país (SANTOS *et al.*, 2018). Isso só será possível, a partir da compreensão dos aspectos biológicos da rainha e da colmeia, intrínsecos ao desenvolvimento, nutrição e comportamento (CAMARGO *et al.*, 2015).

Os pesquisadores têm avaliado no melhoramento genético características como produção de geleia real (FAQUINELLO *et al.*, 2011), comportamento higiênico (COSTA-MAIA *et al.*, 2011; WIELEWSKI *et al.*, 2012), bem como a produção de mel e própolis (GARCIA *et al.*, 2013).

Comparado a outros animais, a informação da interferência de múltiplos fatores, como ambientais, que intervém sob as características fenotípicas em abelha é limitado (Figura 2) (RINDERER; COLLINS; BROWN, 1983; SIMPSON; CASAS, 2010; HALAK, 2012). Dentro desses fatores, a organização das abelhas também dificulta a mensurar parâmetros importantes nos programas de melhoramento (BIENEFELD; EHRHARDT; REINHARDT, 2006; MARTINEZ; SOARES, 2012). Como consequência, a falta de tais conhecimentos interferem no desenvolvimento de novas tecnologias para a apicultura (ALMEIDA, 2008).

Figura 2 - As Interações Entre as Abelhas, Fatores Abióticos e Bióticos, em Conjunto com a Genética de cada Indivíduo Interfere na Expressão do Fenótipo



Fonte: SIMPSON; CASAS (2010).

Com a chegada das ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) a expectativa é de que os pesquisadores possam avançar com a tecnologia e a compreensão dos mecanismos por trás dos aspectos biológicos das abelhas para auxiliar na seleção de caracteres de interesse produtivo (SIMPSON; CASAS, 2010; COBEY; SHEPPARD; TARPY, 2012; LIPPOLIS *et al.*, 2019; GROZINGER; ZAYED, 2020). Uma vez que a informação do RNA permite avaliar as regulações e expressões gênicas quando há exposição à estímulos internos e externos que intervêm na biologia das abelhas (EVANS; WHEELER, 1999; WU *et al.*, 2017; BADAoui *et al.*, 2017; MA; RANGEL; GROZINGER, 2019) é imprescindível o uso de ferramentas de transcriptoma.

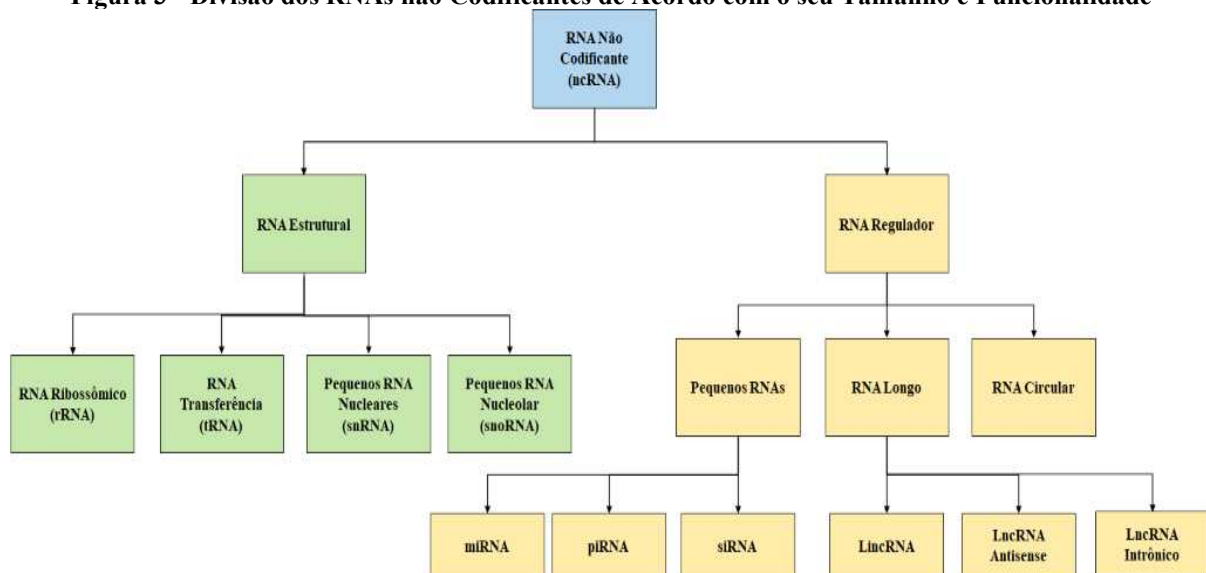
3.3 O Universo de ncRNAs (RNAs Não Codificantes)

Os RNAs (ácido ribonucleico) são moléculas formadas a partir da transcrição da informação contida no DNA (ácido desoxirribonucleico), que se caracterizam estruturalmente por uma fita simples de ribonucleotídeos em sua estrutura molecular (ALBERTS *et al.*, 2017; MENCK; VAN SLUYS, 2017). Essas moléculas são constituídas por um amplo grupo, que incluem RNAs que codificam proteínas (mRNA – RNA mensageiro), presentes em uma pequena parcela do transcriptoma total de um organismo (cerca de 3 a 5%), e RNAs não codificantes (ncRNA) que são caracterizados como estruturais ou reguladores (ALBERTS *et al.*, 2017; MENCK; VAN SLUYS, 2017). Na classe de ncRNAs estruturais inclui-se o tRNA (RNA transportador) e rRNA (RNA – RNA ribossômico), este último pode corresponder a 80% total do transcriptoma, sendo ambos responsáveis pelo maquinário de síntese e tradução de

proteínas (ALBERTS *et al.*, 2017; MENCK; VAN SLUYS, 2017). Além dos ncRNAs estruturais, existe uma pequena parcela que é pouco estudada de ncRNAs reguladores, descritos na literatura como moléculas que não codificam proteínas, mas participam de regulações importantes no organismo, denotados de RNAs não codificantes reguladores (ALBERTS *et al.*, 2017; MENCK; VAN SLUYS, 2017).

Ainda não existe um consenso a respeito da classificação dos ncRNAs, a priori são moléculas que se distinguem de acordo com o seu comprimento, que são classificados como RNAs longos constituídos por mais de 200 nucleotídeos e RNAs curtos, com menos de 200 nucleotídeos (PONJAVIC; PONTING, 2007). A classificação e organização dos grupos de ncRNAs são apresentados conforme Figura 3 (MENCK; VAN SLUYS, 2017).

Figura 3 - Divisão dos RNAs não Codificantes de acordo com o seu Tamanho e Funcionalidade



Fonte: Adaptado de MENCK; VAN SLUYS, 2017; DERRIEN *et al.* (2012).

Já são descritos em literatura ncRNAs com papéis importantes, seja como reguladores de proteínas nos processos de proliferação e apoptose celular (BRENNECKE *et al.*, 2003) ou na pluripotência de células em insetos (PAULI; RINN; SCHIER, 2011). Em abelhas, pequenos RNAs reguladores presentes na geleia real, foram descritos como componentes fundamentais na diferenciação do desenvolvimento (GUO *et al.*, 2013). O comprimento do corpo e o peso ao emergir da rainha, estão entre as características relacionadas aos mecanismos regulatórios por ncRNAs (GUO *et al.*, 2013), embora não se saiba atualmente como, é de fundamental importância compreender a natureza e o aspecto mecânico de regulação por ncRNAs. Neste aspecto, estudos levantam esforços para identificar os mais variados tipos de ncRNAs em *Drosophila sp.* e *A. mellifera*, como piRNA (RNA de Interação com Piwi) (CHAMBEYRON

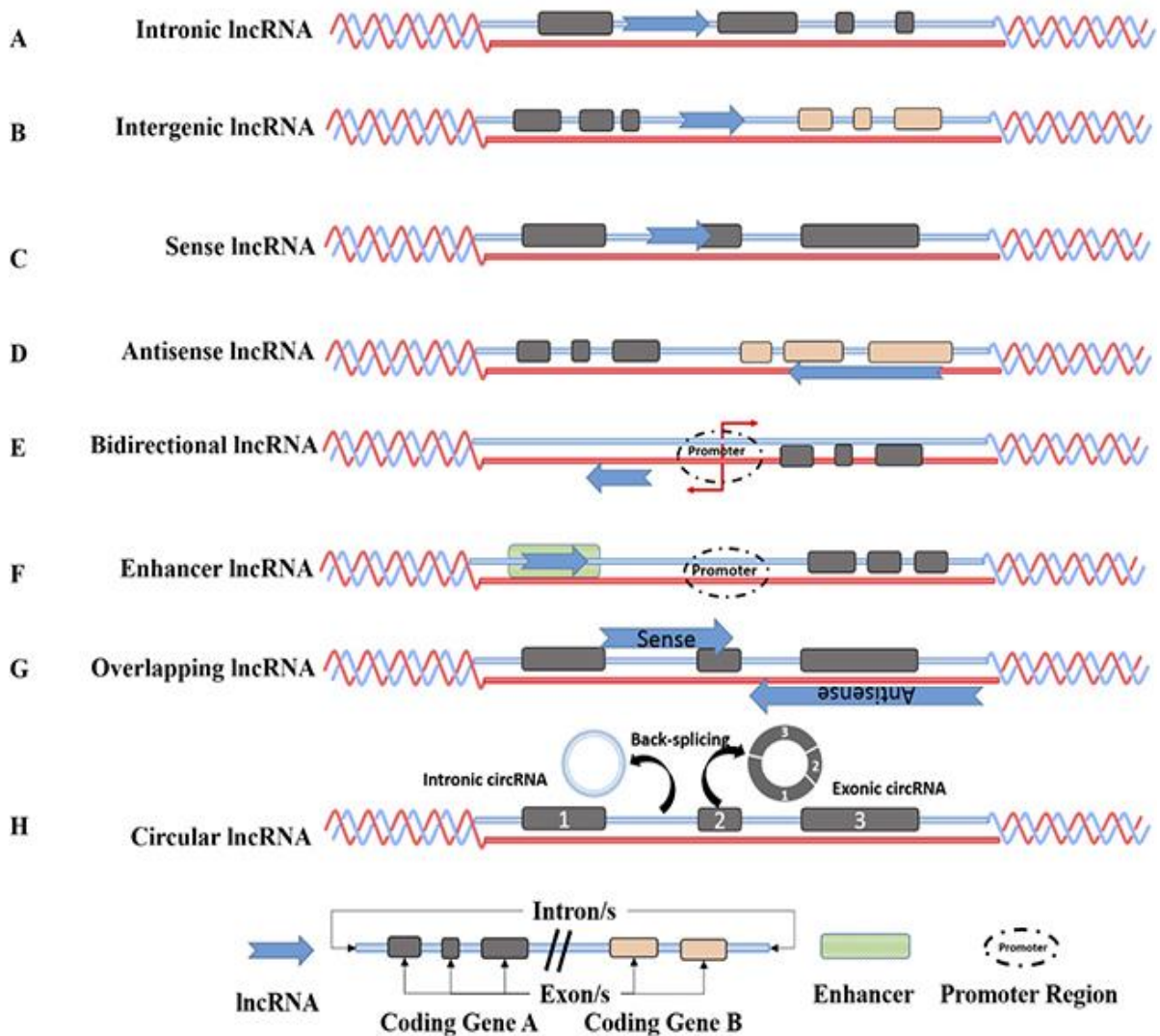
et al., 2008; WANG *et al.*, 2017) e lncRNA (RNA Longo Não Codificante) (WANG *et al.*, 2018; VALANNE *et al.*, 2019).

3.3.1 LncRNA (RNAs Longos Não Codificantes) e seu Proeminente Papel na Biologia

Assim como os mRNA, os lncRNA, são transcritos pela polimerase II e durante a transcrição são poliadenilados e recebem CAP (capeamento) ao final da extremidade 5' do RNA (GUTTMAN *et al.*, 2009; ULITSKY; BARTEL, 2013). Contudo, algumas diferenças notáveis como, baixa expressão e localização nuclear são características dessas moléculas (KAPRANOV *et al.*, 2007; DERRIEN *et al.*, 2012; ILOTT; PONTING, 2013; FANG; FULLWOOD, 2016). Os lncRNAs são um conjunto de RNAs longos sem capacidade de produzir proteínas, caracterizados por constituir mais de 200 nucleotídeos em sua estrutura molecular (PEREIRA, 2017). Esta visão permite distinguir essa categoria de outras RNAs, auxiliando na identificação dessas moléculas em ferramentas computacionais e análise laboratorial (PEREIRA, 2017).

Os lncRNAs, de acordo com o projeto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) proposto em 2012, se caracterizam em cinco biótipos distintos, conforme a localização no genoma (DERRIEN *et al.*, 2012). Conforme Derrien *et al.* (2012) essas classes são divididas em: lincRNA (RNA longo não codificante intergênico), transcritos de sentido sobreposto, transcritos intrônicos, transcritos sem quadro de leitura aberto (ORF) e RNAs antisentido. Outros lncRNAs foram identificados ao longo do tempo os quais estão representados na Figura 4 (RICHARD; EICHHORN, 2018). Os lincRNAs representam o maior número e de maior relevância entre o amplo grupo de lncRNAs (HADJICHARALAMBOUS; LINDSAY, 2019).

Figura 4 - Tipos de lncRNAs Descritos na Literatura

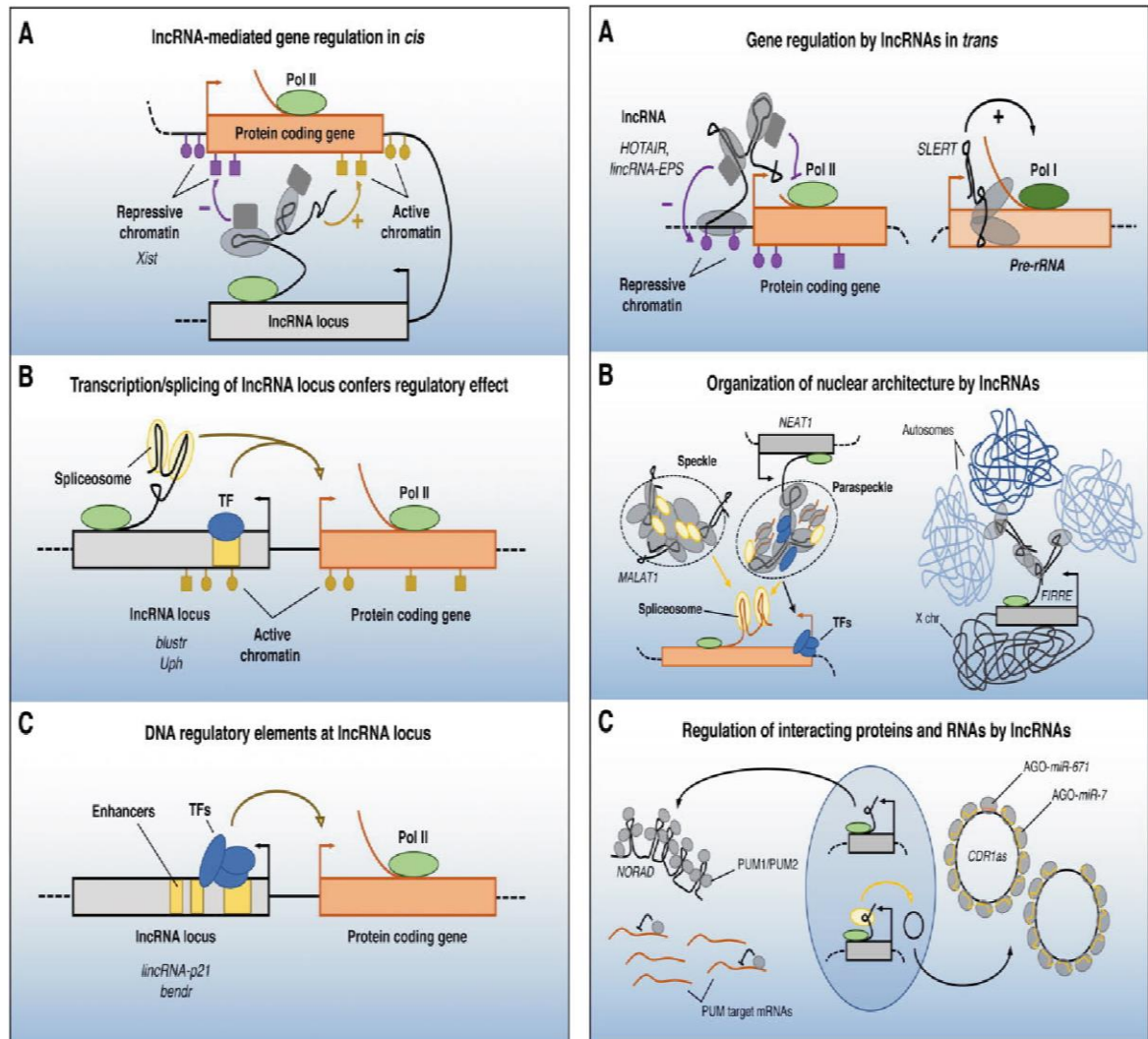


Fonte: RICHARD; EICHHORN (2018).

Pesquisas têm apontado a capacidade desse grupo de moléculas em atuar em diversas funções biológicas de insetos, que abrange a regulação do cromossomo X (ILIK *et al.*, 2013), desenvolvimento (WANG *et al.*, 2018) e espermatogênese (WEN *et al.*, 2016). A compreensão do campo de atuação dos RNAs longos é de suma importância para elucidar os mecanismos moleculares em abelhas à diferentes estímulos.

Os lncRNAs têm capacidade de se dobrar em estruturas secundárias e terciárias (BHAN; SOLEIMANI; MANDAL, 2017), bem como regular regiões vizinhas (*cis*) ou regiões distantes do sítio de transcrição (*trans*), como representado na Figura 5. Essas características possibilitam os lncRNAs interagir com as moléculas de DNA, proteínas e outros RNAs presentes no núcleo ou no citoplasma das células (BHAN; SOLEIMANI; MANDAL, 2017; KOPP; MENDELL, 2018).

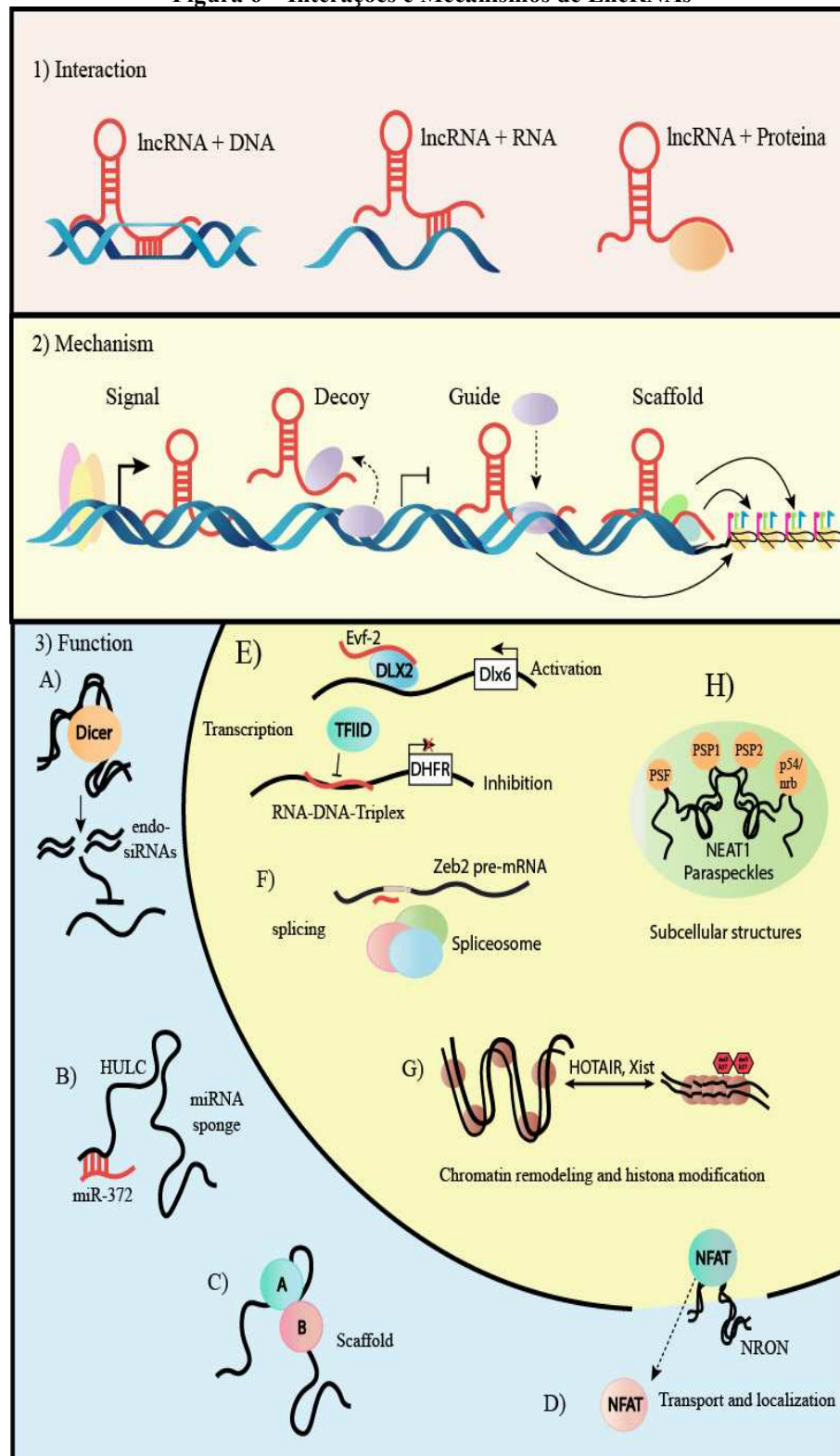
Figura 5 – lncRNA Disposto em *Cis* (A) e *Trans* (B)



Fonte: KOPP; MENDELL (2018).

Os lncRNAs estão envolvidos em diferentes papéis na maquinaria celular (CHENG *et al.*, 2019) (Figura 6). Esses RNAs podem recrutar fatores de transcrição ou ligar-se à RNAs e proteínas para ativar ou reprimir a expressão de sequências específicas do DNA (KOZIOL; RINN, 2010; WANG *et al.*, 2011; BERGHOFF *et al.*, 2013). Também podem interferir na formação dos *spliceossomos*, regular o *splicing* alternativo de pré-mRNAs (TRIPATHI *et al.*, 2010; TSUIJI *et al.*, 2011) ou agir diretamente na tradução proteica (CARRIERI *et al.*, 2012). Nos insetos eussociais, como *A. mellifera*, os lncRNAs foram identificados atuando no metabolismo de RNA (KIYA *et al.*, 2012), interagindo com outros pequenos RNAs, bem como o metabolismo de DNA agindo como transdutor de sinais de genes (CHEN *et al.*, 2019).

Figura 6 – Interações e Mecanismos de LncRNAs



Fonte: GUTSCHNER; DIEDERICH, 2012; CHENG *et al.* (2019).

Atualmente, são poucos os lncRNAs caracterizados em abelhas. Os RNAs *Ks-1* (SAWATA *et al.*, 2002), *nb-1* (TADANO *et al.*, 2009), *Kakusei* (KIYA *et al.*, 2012) e *lncov2* (HUMANN; TIBERIO; HARTFELDER, 2013) estão no grupo dos lncRNAs validados

experimentalmente. Além desses, o *lncov1* expresso durante o desenvolvimento ovariano das abelhas operárias durante a alimentação larval (HUMANN; TIBERIO; HARTFELDER, 2013) e o *AncR-1* que também está relacionado ao desenvolvimento dos órgãos sexuais de machos e fêmeas, além da glândula hipofarigeana (SAWATA *et al.*, 2004).

Além das características morfológicas, os lncRNAs também participam de respostas biológicas desencadeadas por microrganismos. O estudo realizado por Chen *et al.* (2019) identificou 257 lncRNAs diferencialmente expressos responsáveis na regulação imunológica de abelhas infectadas pelo fungo *Nosema ceranae* (Nosematidae). Conforme o autor, alguns desses RNAs podem competir ou interagir com outros miRNAs para desencadear respostas à infecção desse fungo (CHEN *et al.*, 2019). Também foi relatado a presença de 11 lncRNAs intergênicos regulados durante a infecção causada pelo vírus *Sacbrood* (SBV) (JAYAKODI *et al.*, 2015). No entanto, os mecanismos de lncRNAs intrínsecos às respostas imunológicas são ainda desconhecidos (SATYAVATHI; GHOSH; SUBRAMANIAN, 2017).

Apesar de alguns estudos fornecerem informações do modo de ação e funções dos lncRNAs, pouco se sabe da presença e mecanismos dessas moléculas em *A. mellifera* (HUMANN; TIBERIO; HARTFELDER, 2013; CHEN *et al.*, 2019). Além do mais, com o uso de métodos computacionais e a possibilidade de acesso a bancos de dados públicos (cada vez mais crescente) tem se tornado menos custoso, mais rápido e objetivo os estudos de aspectos moleculares diversos em organismos biológicos. Todavia, o avanço de abordagens de bioinformática pode auxiliar as novas descobertas acerca de lncRNAs em abelhas (LEGÉAI; DERRIEN, 2015) e sua relação ecológica.

3.4 Bioinformática para Leigos: A Interpretação Além de *Scripts*

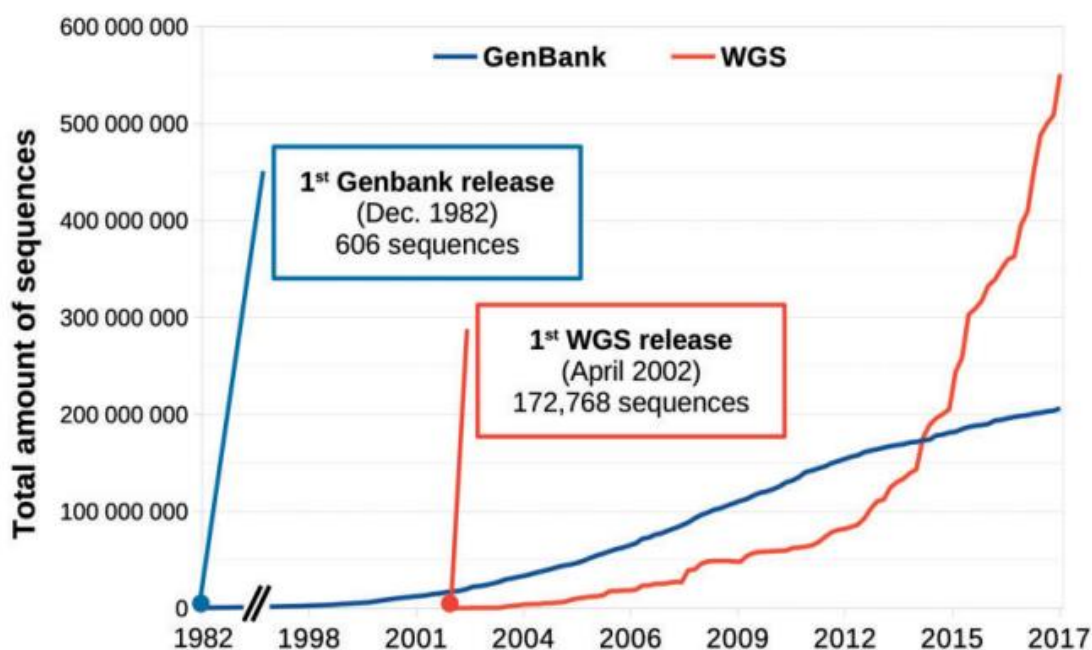
O campo da bioinformática engloba a interação de diversas áreas (matemática, física, estática, computação e biologia) para formular ferramentas computacionais que possam processar e analisar dados moleculares para responder questões biológicas (BAYAT, 2002; CAN, 2013), mas não somente criar ferramentas, a bioinformática é uma importante interface para interpretar dados biológicos.

O marco inicial da bioinformática foi na década de 1960, com o estudo liderado por Margaret Dayhoff para a criação do primeiro banco de dados de sequências proteicas (XIONG, 2006). No entanto, somente nos anos 90 com o Projeto do Genoma Humano, que a bioinformática foi consagrada como uma disciplina importante (CHEN, 2015; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES; U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, 1990).

Por meio da tecnologia de sequenciamento de DNA e mais tarde de bancos de cDNA derivados de RNAs, a quantidade de informações biológicas aumentou significativamente (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; LOWE *et al.*, 2017). O excesso de dados, trouxe consigo a necessidade do apoio de ferramentas de bioinformática para que esses dados possam ser curados, montados, armazenados, recuperados e processados (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; LOWE *et al.*, 2017). É válido ressaltar a importância de Richard Stallman e seu manifesto que motivou a criação do sistema GNU dando origem tempo depois ao conhecido LINUX (sistema operacional de código aberto), tornando agora a criação de ferramentas e o uso de linguagem computacional mais democrática (GAUTHIER *et al.*, 2018).

A era bioinformática, portanto paralela à genômica, tem sido classificada por importantes avanços tecnológicos, mas não só isso. O número de sequências depositadas em bancos públicos tem sido exponencialmente ascendente, conforme a Figura 7 de Gauthier *et al.* (2018). Somente no ano de 2017, foram registradas pouco mais de 500.000.000 de sequências (GAUTHIER *et al.*, 2018). É inegável a busca por profissionais capacitados à criação de ferramentas, para a análise e principalmente, a interpretação de tais informações. Contudo, neste tópico serão apresentados os importantes desfechos da bioinformática no Brasil, além da sua contribuição em ciências agrárias e abordagens mais comuns nesse campo de estudo.

Figura 7 – Número de Sequências Depositadas nos Bancos de Dados WGS e NCBI Genbank



Fonte: GAUTHIER *et al.* (2018).

Da mesma forma que houve o aumento no número de sequências depositadas, os bancos de dados evoluíram (VAMATHEVAN; APWEILER; BIRNEY, 2019). A importância dos bancos de dados não inclui apenas o repositório das sequências de proteínas e ácidos nucleicos, mas também as informações como a base de nucleotídeos ou aminoácidos, presença de íntrons, localização genômica, domínios da proteína e funções (SRINIVASA; SIDDESH; MANISEKHAR, 2020).

Há uma infinidade de banco de dados, apenas em 2014 existiam 1552 de dados biológico armazenados conforme a especificidade e/ou organismo (FERNÁNDEZ-SUÁREZ; RIGDEN; GALPERIN, 2013; ZOU *et al.*, 2015). Parte desses bancos de dados são especializados em ácidos nucleicos - GenBank (BENSON *et al.*, 2012), transcritos - RNAcentral (CONSORTIUM, 2018) e Expression Atlas (PAPATHEODOROU *et al.*, 2019), proteínas - UniProt (CONSORTIUM, 2018) e Worldwide Protein Data Bank organization (WWPDB CONSORTIUM, 2018), enzimas - Enzyme Portal (PUNDIR *et al.*, 2017) e metabólitos - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (KANEHISA *et al.*, 2020). Ainda existem bancos de dados que armazenam informações de metagenômica - MG-RAST (MEYER *et al.*, 2008) e MGnify (MITCHELL *et al.*, 2019) e transposons - Repbase (BAO; KOJIMA; KOHANY, 2015), bem como outros tipos de informações, descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Banco de Dados Disponíveis na Web

Banco de Dados	URL
European Nucleotide Archive (ENA)	https://www.ebi.ac.uk/ena
International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC)	http://www.insdc.org/
DNA Databank of Japan (DDBJ)	https://www.ddbj.nig.ac.jp/
GenBank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
Worldwide Protein Data Bank organization (wwPDB)	http://www.wwpdb.org/
RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB)	http://www.rcsb.org/
Protein Data Bank in Europe (PDBe)	http://www.pdbe.org/
Electron Microscopy Data Bank (EMDB)	http://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb
European Genome-Phenome Archive (EGA)	https://ega-archive.org
Database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap
The Human Induced Pluripotent Stem Cells Initiative (HipSci)	http://www.hipsci.org/
International Cancer Genome Consortium (ICGC)	https://icgc.org/
MGnify	https://www.ebi.ac.uk/metagenomics
MG-RAST	https://www.mg-rast.org/
MetabolomeXchange	http://www.metabolomexchange.org/
MetaboLights	https://www.ebi.ac.uk/metabolights
Ensembl database and genome browser	https://www.ensembl.org/
Expression Atlas	https://www.ebi.ac.uk/gxa
UniProt Consortium	https://www.uniprot.org/
Enzyme Portal	https://www.ebi.ac.uk/enzymeportal
Reactome	https://reactome.org/
IntAct Molecular Interaction Database (IntAct)	https://www.ebi.ac.uk/intact
FlyBase	https://flybase.org/
Plasmodium Genomic Resource (PlasmoDB)	http://plasmodb.org/plasmo
RNAcentral	https://rnacentral.org/
Europe PMC	https://europepmc.org/
EBI Search	https://www.ebi.ac.uk/ebisearch
Open Targets Platform	https://www.targetvalidation.org/
Patient Derived Xenograft (PDX) Finder	http://www.pdxfinder.org/
Ontology LookUp Service	https://www.ebi.ac.uk/ols
ELIXIR, the European Life-science Infrastructure for Biological Information	https://www.elixir-europe.org/
Biobanking and BioMolecular resources Research Infrastructure (BBMRI-ERIC)	http://www.bbmri-eric.eu/
Genome Reference Consortium (GRC)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc
Ensembl Variant Effect Predictor (Ensembl VEP)	https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	https://www.genome.jp/kegg/
Rebase	https://www.girinst.org/rebase/

Fonte: adaptado VAMATHEVAN; APWEILER; BIRNEY (2019).

Com base na necessidade atual de recursos que permitam a manipulação dos dados em bioinformática, existem iniciativas que disponibilizam *pipelines* que integram ferramentas computacionais e *scripts* para facilitar a execução das análises e visualização dos resultados (LEIPZIG, 2016). Essas iniciativas são fundamentais, principalmente para a identificação funcional de moléculas recém descobertas, como o caso de ncRNAs que exige recursos

computacionais mais complexo dada a sua natureza estrutural e biológica (BACKOFEN *et al.*, 2017).

Dentro do grupo de ferramentas disponíveis, o Galaxy, desenvolvido em 2005, é uma plataforma pública integrada à web, comumente utilizada (LEIPZIG, 2016; AFGAN *et al.*, 2018). O Galaxy está disponível em três servidores principais (Galaxy Australia, Europa e Main) que incluem *pipelines* para genômica, transcriptoma, proteômica, metabolômica, metagenômica e metatranscriptoma (GOECKS *et al.*, 2010; BLANKENBERG *et al.*, 2014; AFGAN *et al.*, 2018; BATUT *et al.*, 2018; JALILI *et al.*, 2020). Além do Galaxy, há outras plataformas com diferentes interfaces e ferramentas como Taverna (WOLSTENCROFT *et al.*, 2013), Snakemake (KÖSTER; RAHMANN, 2012) e Ruffus (GOODSTADT, 2010). Essas e outras plataformas estão descritas na Tabela 2 conforme seu uso, acessibilidade, facilidade e interface (LEIPZIG, 2016).

Tabela 2 - Plataformas que Fornecem *Pipelines* para o Uso em Bioinformática

Ferramenta	Interface	Facilidade no desenvolvimento	Facilidade no uso	Performance
Snakemake	Linha de Comando	★★★★☆	★★★★☆	★★★☆☆
Nextflow		★★★★☆	★★★★☆	★★★☆☆
BigDataScript		★★★★☆	★★★★☆	★★★☆☆
Ruffus		★★★★★	★★★★★	★★★☆☆
bpipe		★★★★★	★★★★★	★★★☆☆
Pegasus		★★★☆☆	★★★☆☆	★★★★★
Queue		★★★☆☆	★★★☆☆	★★★★★

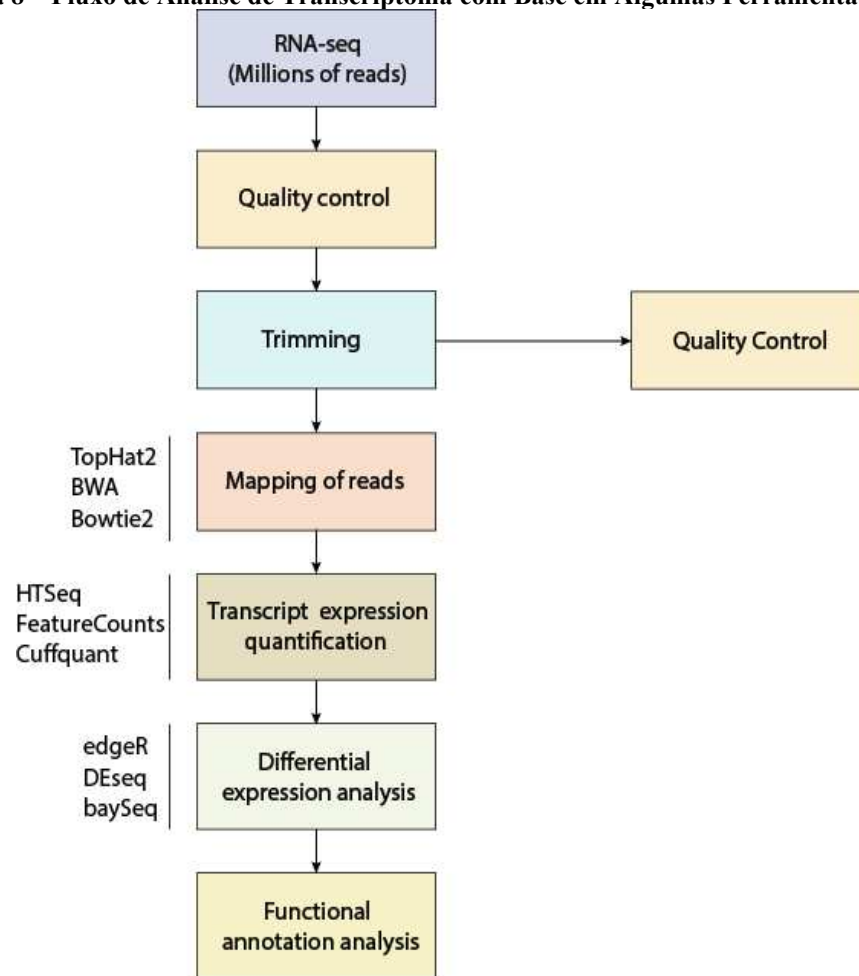
Tabela 2 - Plataformas que Fornecem *Pipelines* para o Uso em Bioinformática

Ferramenta	Interface	Facilidade no desenvolvimento	Facilidade no uso	Performance
Toil	Linha de Comando			
Luigi				
Galaxy	Código Aberto, Servidor e Workbench			
Taverna				
DNAexus	Comercial e Nuvem			
Arvados	Código Aberto e Nuvem API			
Agave				

Fonte: adaptado LEIPZIG (2016).

O fluxo de trabalho para análise dessas sequências requer determinadas ferramentas computacionais conforme o objetivo do trabalho (Figura 8) (VAN VERK *et al.*, 2013; LOWE *et al.*, 2017). Ferramentas que incluem banco de dados (armazenamento de sequência), alinhamento, controle de qualidade são comumente utilizadas para pesquisas de análise de expressão diferencial e anotação funcional de RNAs oriundos de procariotos e eucariotos (BACKOFEN *et al.*, 2017; LOWE *et al.*, 2017; SHAKYA *et al.*, 2019).

Figura 8 – Fluxo de Análise de Transcriptoma com Base em Algumas Ferramentas



Fonte: adaptado VAN VERK et al., 2013; POBRE; ARRAIANO (2018).

A partir do conjunto de análises computacionais, a bioinformática pode auxiliar na investigação de genes e regulações relacionados ao câncer na medicina (YANG *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2020) e biomarcadores ligados a transtornos psíquicos (ZHAO *et al.*, 2016) e à atividade física (BYE *et al.*, 2013). Não apenas isso, como esteve presente na busca por novas drogas no campo farmacêutico (COX *et al.*, 2006) e nas ciências agrárias em estudos de planta-patógeno (ZHANG *et al.*, 2014), nutrição animal (ABERNATHY *et al.*, 2017), produção de carne e leite (WICKRAMASINGHE *et al.*, 2012; GHOSH *et al.*, 2016; FONSECA *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2019).

Em abelhas, a bioinformática contribuiu em estudos de transcriptoma e metatranscriptoma, para compreender a regulação de RNAs na produção de geleia real (NIE *et al.*, 2020), aspecto comportamentais (MA; RANGEL; GROZINGER, 2019), microbioma intestinal (LEE *et al.*, 2014) e resposta à infecção de patógenos (CHEN *et al.*, 2019).

3.4.1 RNA-Seq: A Revolução da Tecnologia de RNA

A definição de transcriptoma engloba o conjunto de transcritos (mRNAs e RNAs não codificantes) disponíveis na célula sob estímulos ambientais específicos em um determinado momento do estágio celular (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009; MARCO-PUCHE *et al.*, 2019). Em estudos de transcriptoma a tecnologia do sequenciamento de RNA (RNA-seq), baseado no sequenciamento de última geração (NGS), é a mais difundida (LI; LI, 2018). Esta técnica de sequenciamento permite com que o cientista possa trabalhar com diferentes análises em bioinformática como análise de expressão diferencial, identificar genes individualmente (KOCH *et al.*, 2018) à enriquecimento funcional (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005).

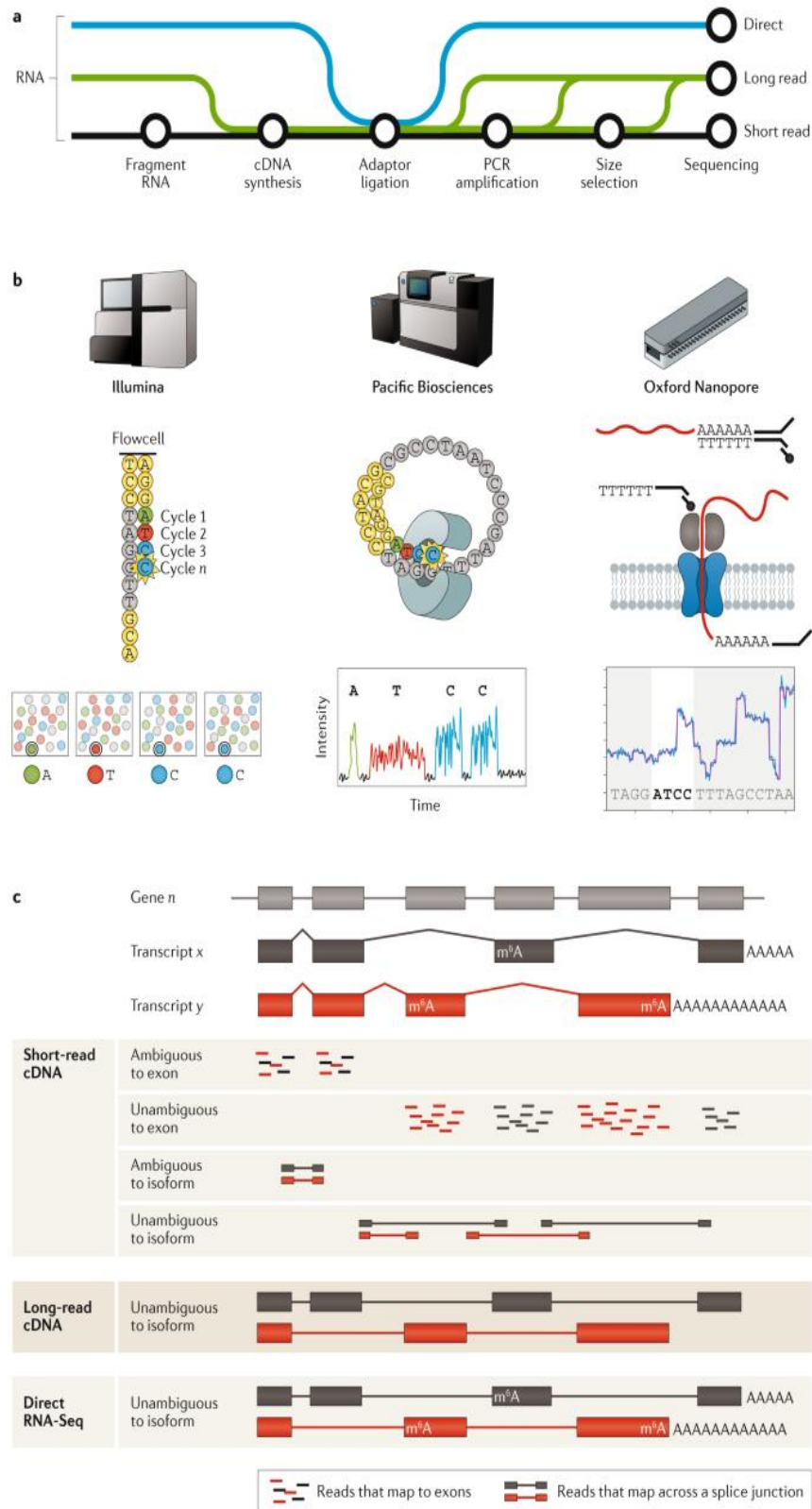
As análises de RNA-seq, frente às outras abordagens de sequenciamento permitiu com que os pesquisadores pudessem estudar organismos não-modelo (VERA *et al.*, 2008), identificação de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) (CLOONAN *et al.*, 2008), padrão de metilação do DNA (COKUS *et al.*, 2008), identificação mais precisa dos transcritos e isoformas, bem como modificações pós-transcricionais (MARGUERAT; BÄHLER, 2009). Além de possibilitar a utilização da montagem *de novo* de transcritos e genes sem a necessidade do genoma de referência em um curto período de tempo comparado a outras tecnologias de sequenciamento (COKUS *et al.*, 2008; ROBERTS *et al.*, 2011).

Com a grande quantidade de leituras geradas, pode ocorrer distorções dos reais resultados, sendo, portanto, necessário delinear o experimento baseado no número de réplica biológica e a profundidade das leituras para validar a expressão significativa dos resultados (CONESA *et al.*, 2016; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Para análise de expressão diferencial, apenas três réplicas são o suficiente para identificar o viés das amostras (SCHURCH *et al.*, 2016; LAMARRE *et al.*, 2018). Enquanto para a profundidade (número de leituras por amostra) as amostras devem ter no mínimo de 1 à 30 milhões de leituras (THE ENCODE CONSORTIUM, 2011; LEI *et al.*, 2015; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Embora o tipo de adaptador seja escolhido conforme o custo, existem particularidades que os incluem na lista de requisitos para avaliar durante o experimento (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Isso é, as leituras pareadas por ter a informação das duas sequências são mais fáceis para realizar a montagem das leituras (RISCA; GREENLEAF, 2015), e se torna o adaptador mais adequado para análise de isoformas (KATZ *et al.*, 2010). Em contrapartida, as vantagens das leituras de extremidade única incluem o aumento da profundidade das leituras e o número de réplicas biológicas (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Ao delinear o experimento conforme o objetivo, os passos seguintes para a análise de RNA-seq são a preparação e o sequenciamento das moléculas de RNA no ambiente laboratorial (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Os protocolos de sequenciamento incluem as etapas: I) extração de RNA total ou parcial do organismo de interesse; II) enriquecimento de mRNA com cauda poli A ou retirada de RNA ribossômico; III) Construção da biblioteca de cDNA e ligação dos adaptadores (*single-end* ou *paired-end*); IV) Sequenciamento da biblioteca de cDNA em sequenciadores de alto rendimento (Illumina, Pacific Biosciences ou Nanopore) (WANG *et al.*, 2009; KUKURBA; MONTGOMERY, 2015; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Conforme a metodologia utilizada para o sequenciamento, são geradas leituras curtas ou longas de extremidade pareada ou única (Figura 9) (WANG *et al.*, 2009; KUKURBA; MONTGOMERY, 2015; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Figura 9 - Fluxo de Análise de RNA-seq com Base em Três Tecnologias de Sequenciamento



Fonte: STARK; GRZELAK; HADFIELD (2019).

Após o sequenciamento do RNA, o conjunto de dados é processado em um fluxo de análises computacionais (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). A etapa inicial, requer alinhamento ou montagem das leituras contra um genoma ou transcriptoma de referência para construir o transcriptoma (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Seguido desse passo, é feita a quantificação das sequências, filtragem e normalização para retirar leituras de baixa qualidade (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Por fim, é realizada a análise de expressão diferencial dos transcritos para avaliar alterações na expressão dos transcritos entre as amostras de interesse (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Com base na metodologia de RNA-seq foram desenvolvidos diversos protocolos nos últimos anos. Muitos desses protocolos foram adaptados para o sequenciamento de leituras curtas fornecido pela plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, Califórnia) (KODAMA; SHUMWAY; LEINONEN, 2011; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Apenas em 2011, as leituras curtas representaram aproximadamente 84% de sequências depositadas no banco de dados SRA (*Short Read Archive*) (KODAMA; SHUMWAY; LEINONEN, 2011; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Pelo aumento da demanda das abordagens de RNA-seq nas análises de RNA, houve a exigência da inclusão e aprimoramento dos recursos computacionais existentes para lidar com o grande conjunto de dados gerados (KOCH *et al.*, 2018; LI; LI, 2018). Estima-se que em um intervalo de dez anos, aproximadamente 2000 mil ferramentas foram criadas para facilitar no processamento de cada etapa de análise (LI; LI, 2018). Por trás dessas ferramentas há uma variedade de algoritmos e análises estatísticas para aumentar a confiabilidade dos dados (COSTA-SILVA; DOMINGUES; LOPES, 2017; LI, 2019). Atualmente, existem algumas ferramentas computacionais que são comumente utilizadas nas análises de RNA-seq (Tabela 3).

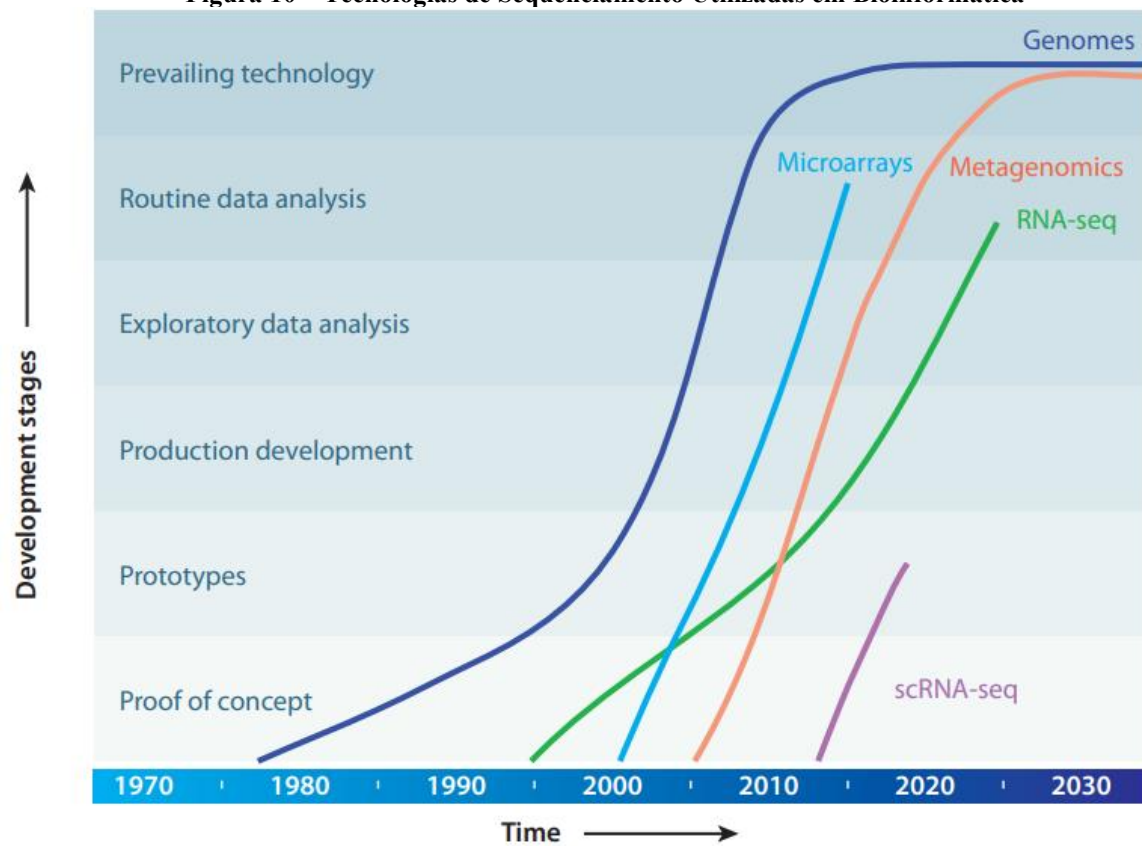
Tabela 3 - Softwares Utilizados para as Etapas de Análises de RNA-seq

Ferramenta	Montagem e/ou Alinhamento	Quantificação	Normalização	Diferencialmente Expresso	
TopHat	Genoma de referência e anotação	Sem aplicação	Sem aplicação	Sem aplicação	
STAR					
HISAT					
SOAPdenovo-Trans	Montagem <i>de novo</i>	Estimativas de transcrição			
StringTie					
Kallisto	Montagem sem alinhamento	Ler contagens de regiões não sobrepostas de características anotadas			
Salmon					
Cufflinks					
RSEM					
MMSeq	Sem aplicação	Estimativas de transcrição convertido em contagens de leitura			Média aparada de valores M
HTSeq					
FeatureCounts					
Tximport			Vários	Transformação de média-variância e modelagem linear generalizada	
EdgeR					
Limma + Voom			Sem aplicação	Sem aplicação	Entrada de StringTie, RSEM ou quantificação (sem alinhamento) e modelagem linear generalizada
DESeq2					
Ballgown					
CuffDiff					Expressão diferencial a partir da análise estimada do Cufflinks

Fonte: STARK; GRZELAK; HADFIELD (2019).

As tecnologias atuais são apenas uma ponta do iceberg para a descoberta de novos mecanismos moleculares e desenvolvimento de novas metodologias de análise em bioinformática (VAMATHEVAN; APWEILER; BIRNEY, 2019). Atualmente a ciência busca desenvolver novas tecnologias com melhor rendimento e com menores custos, no entanto, leva-se anos para que essa tecnologia se torne padrão (VAMATHEVAN; APWEILER; BIRNEY, 2019). Além disso, essas técnicas acabam sendo substituídas por outras, como o caso do microarray que caiu em desuso com a chegada do RNA-seq (VAMATHEVAN; APWEILER; BIRNEY, 2019), no qual está detalhado na Figura 10.

Figura 10 – Tecnologias de Sequenciamento Utilizadas em Bioinformática



Fonte: VAMATHEVAN; APWEILER; BIRNEY (2019).

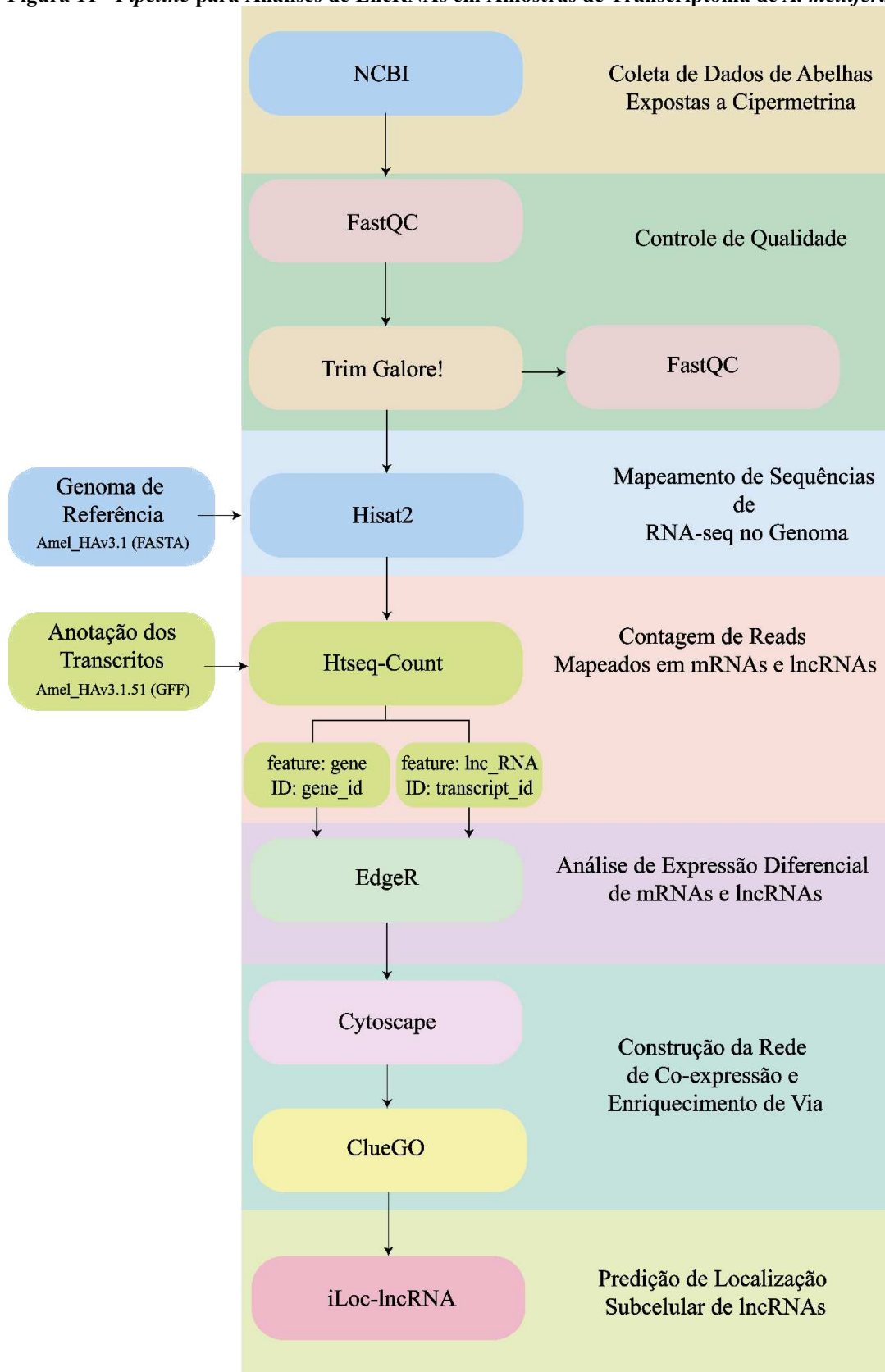
Devido ao grande acúmulo de dados de transcriptoma de abelhas, a bioinformática será uma grande aliada em pesquisas futuras. Portanto, este estudo visa investigar a presença de lncRNAs em abelhas submetidas a exposição de inseticida (cipermetrina), a fim de entender as funções biológicas dessas moléculas em abelhas.

4 METODOLOGIA

O processo de delineamento do presente trabalho, foi embasado em métodos computacionais, a fim de verificar a presença, tipo, origem, caracterização e expressão de RNAs Longos Não Codificantes (lncRNAs) do transcriptoma de *A. mellifera carnica* exposta a duas dosagens ao inseticida cipermetrina.

Para as análises, os dados de transcriptoma de *A. mellifera* foram coletados no NCBI, nos quais passaram por avaliação quanto a sua qualidade (FastQC) e retirados seus adaptadores (Trim Galore!). Posteriormente foi realizado mapeamento (Hisat2) contra genoma de referência. A partir disso os transcritos foram quantificados com base no *feature* e *ID* de genes e lncRNAs (Htseq-count) conforme o arquivo GFF de *A. mellifera*, seguido da análise de expressão diferencial (EdgeR). Com isso, esses dados obtidos foram utilizados para a análise funcional dos transcritos e rede de co-expressão (ClueGO e Cytoscape). Os lncRNAs correlacionados a outros RNAs foram avaliados enquanto a localização subcelular. O detalhamento do *pipeline* de análises está disposto conforme a Figura 11.

Figura 11 - Pipeline para Análises de LncRNAs em Amostras de Transcriptoma de *A. mellifera*



Fonte: Próprio Autor (2021).

4.1 Varredura em Bancos de Dados Públicos e *Dataset* de RNA-Seq

As amostras de cDNA selecionadas foram extraídas do *Sequence Read Archive* (SRA) presente no banco de dados público *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seleção do *dataset* seguiu com base no transcriptoma obtido pela metodologia de RNA-seq, o número de réplicas (≥ 3) e a exposição de abelhas ao agrotóxico, assim como, a quantidade de *reads* derivadas do experimento. A partir desses critérios, foi coletado o transcriptoma de *Apis mellifera carnica* exposta a cipermetrina em diferentes dosagens a partir do experimento realizado por Fent, Schmid e Christen (2020).

Em síntese, o experimento conduzido por Fent, Schmid e Christen (2020), foi realizado por meio da exposição de operárias (*A. mellifera carnica*) a duas dosagens do inseticida cipermetrina (0,3 ng/abelha e 3 ng/abelha) por 48 horas. Posteriormente, foi extraído o RNA do cérebro e submetido ao sequenciamento pelo sistema Illumina HiSeq 4000 (FENT; SCHMID; CHRISTEN, 2020). A informação dos dados de RNA-seq de cipermetrina estão descritas na Tabela 4, conforme o código de identificação (*Bioproject*).

Tabela 4 - Conjunto de Amostras de *Apis mellifera carnica* Exposta a Cipermetrina Conforme o *Bioproject*, Tipo de Adaptador Utilizado (Tecnologia), Corridas, Código, Bytes, Bases e Amostras.

<i>Bioproject</i>	Tecnologia	<i>Run</i>	Código	Amostras	Bytes	Bases
		SRR8297891	Controle1	Controle	968.18 Mb	2.87 G
		SRR8297882	Controle2	Controle	1.30 Gb	3.93 G
		SRR8297883	Controle3	Controle	507.68 Mb	1.51 G
		SRR8297886	CiperZT1	Cipermetrina 0,3ng/abelha	1.00 Gb	3.04 G
		SRR8297887	CiperZT2	Cipermetrina 0,3ng/abelha	2.54 Gb	7.70 G
PRJNA509310	<i>Single-end</i>	SRR8297888	CiperZT3	Cipermetrina 0,3ng/abelha	1.28 Gb	3.88 G
		SRR8297889	CiperZT4	Cipermetrina 0,3ng/abelha	923.19 Mb	2.75 G
		SRR8297880	CiperZT5	Cipermetrina 0,3ng/abelha	1.07 Gb	3.17 G
		SRR8297881	CiperT1	Cipermetrina 3ng/abelha	1.12 Gb	3.39 G
		SRR8297884	CiperT2	Cipermetrina 3ng/abelha	1.22 Gb	3.71 G
		SRR8297885	CiperT3	Cipermetrina 3ng/abelha	1.22 Gb	3.72 G
		SRR8297890	CiperT4	Cipermetrina 3ng/abelha	980.13 Mb	2.90 G
Total						42.57 G

Fonte: Próprio Autor (2021).

Os arquivos de entrada utilizados das análises subsequentes incluem o genoma de referência de *A. mellifera* Amel_HAv3.1 em formato de arquivo FASTA, tal como as anotações do conjunto do transcriptoma Amel_HAv3.1.51 em formato GFF. Ambos os arquivos estão depositados no Banco de Dados Público *EnsemblMetazoa* (<https://metazoa.ensembl.org/>).

4.2 Plataforma e Controle de Qualidade

Todas as corridas do conjunto de dados de cipermetrina extraídas do banco de dados NCBI, foram baixados na plataforma *Galaxy Europe* (<https://usegalaxy.eu/>) (AFGAN *et al.*, 2016) e foram submetidas ao controle de qualidade. A etapa de qualidade foi realizada utilizando as ferramentas FastQC (ANDREWS, 2010) e Trim Galore! (KRUEGER, 2021) depositadas na plataforma *Galaxy Europe*.

Dessa forma, ao realizar a análise do relatório gerada pelo FastQC, os arquivos em formato fastq.gz foram submetidos à ferramenta Trim Galore! para a remoção do restante dos adaptadores presentes, leituras curtas de até 20 pb (par de bases) e de baixa qualidade (KRUEGER, 2021). A partir da etapa de *trimming*, novamente, as corridas foram processadas no FastQC para avaliar se houve a retirada do conjunto de adaptadores e sequências de baixa qualidade.

4.3 Mapeamento de Sequências do RNA-Seq no Genoma

A ferramenta Hisat2 (KIM *et al.*, 2015) disponível no *Galaxy Europe* foi utilizada para realizar o mapeamento das leituras, com parâmetros padrões de análise. Nessa etapa, foi utilizado o arquivo FASTA do genoma (Amel_HAv3.1), no qual foi alinhado contra as leituras (formato .gz) de cada conjunto de dado selecionado.

4.4 Contagem de Reads Mapeados em lncRNAs e mRNAs

O arquivo BAM gerado no Hisat2 após mapeamento e a anotação dos transcritos Amel_HAv3.1.51 (formato GFF) foram utilizados para realizar a quantificação de lncRNAs e genes no software Htseq-count (ANDERS; PYL; HUBER, 2014). Em síntese, os parâmetros utilizados para captura da contagem de genes codificantes foram com base no gene (feature) e gene_id (ID attribute). Em contrapartida, para os lncRNAs foi utilizado os parâmetros lnc_RNA (feature) e transcript_ID (ID attribute). Esses critérios foram utilizados com base no arquivo de anotação dos transcritos de *A. mellifera* (arquivo GFF).

A partir disso, os dados de quantificação obtidos no Htseq-count, foram compactados para gerar a matriz de contagem para genes codificantes e lncRNAs. Para tal foi utilizado a ferramenta *Generate Count Matrix* (AFGAN *et al.*, 2015). É válido ressaltar que essa etapa foi realizada no servidor *Galaxy Australia* (<https://usegalaxy.org.au/>).

4.5 Análise de Expressão Diferencial

A tabela gerada pelo *Generate Count Matrix* foi utilizada como arquivo de entrada na análise de expressão diferencial. Para a análise foi utilizado a ferramenta EdgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009) para avaliar o perfil de expressão de genes codificantes e lncRNAs diferencialmente expressos entre as amostras com cipermetrina (0,3 e 3 ng) e controle.

O EdgeR permite realizar a análise de expressão diferencial conforme cálculos estatísticos (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009; CHEN, 2020), dessa forma foi utilizado a filtragem de transcritos com contagens maiores que 5%.

Os resultados obtidos são gerados a partir da normalização da profundidade dos dados e utiliza uma análise de contraste entre dois conjuntos de amostras distintas, essa etapa é feita conforme a contagem dos transcritos (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009), neste caso, foram as contagens obtidas anteriormente com o Htseq-count.

A tabela gerada pelo EdgeR (tabular) contendo as amostras foram filtradas a partir da significância e suporte estatístico por FDR (*False Discovery Rate*), no qual foi admitido o valor de $FDR \leq 0,05$. Posteriormente, a partir do logFC (*log Fold Change*) dos lncRNAs e mRNAs diferencialmente expressos foi realizado para análise no heatmap2.

4.6 Análise de Co-Expressão e Enriquecimento de Vias Funcionais

As análises de enriquecimento funcional e rede de co-expressão foram realizadas conforme descrito por Contreras-López *et al.* (2018). Dessa forma, os dados dos transcritos diferencialmente expressos gerados pelo edgeR foram normalizados em R v.4.1.1 com o pacote EBSeq (LENG *et al.*, 2013). Os dados normalizados foram utilizados para calcular a correlação com o pacote psych (REVELLE, 2021) com os seguintes parâmetros: $\log_2FC > 0,9$ e *p-value* ajustado $\leq 0,01$.

Posteriormente, os transcritos foram transferidos à ferramenta ClueGO para análise funcional (BINDEA *et al.*, 2009) com enriquecimento de via através dos bancos de dados KEGG e GO (Gene Ontology) com base no ID. A análise de co-expressão foi feita no Cytoscape (SHANNON, 2003) com o auxílio do clusterMaker (MORRIS *et al.*, 2011).

4.7 Predição de Localização Subcelular

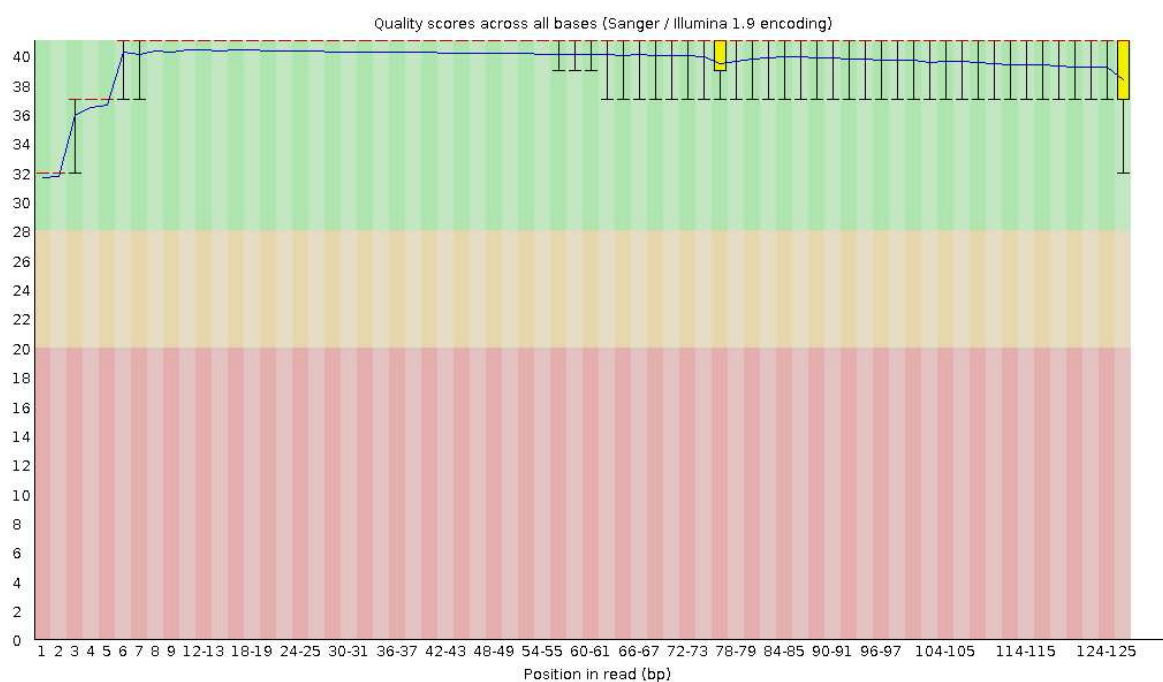
As sequências dos lncRNAs correlacionados a outros RNAs foram utilizados para predição da localização subcelular foi realizado por meio da ferramenta iLoc-lncRNA (SU *et al.*, 2018) disponibilizado no repositório RNALocate (CUI *et al.*, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade de dados de RNAseq

As leituras analisadas no FastQC, após a etapa de *trimming*, obtiveram ótimo score de qualidade, com *Phred* acima de 28 (cor verde no eixo y) em todas as corridas geradas pelo sequenciamento Illumina (*Short Read Archive*), conforme realizado por Fent, Schmid e Christen (2020). Dessa forma, foi escolhida a corrida SRR8297881 do grupo de cipermetrina 3 ng, conforme a Figura 12, para demonstração da qualidade das leituras, visto que as corridas apresentaram boa qualidade.

Figura 12 – Demonstração da Qualidade das Leituras de SRR8297881 pelo Gráfico *Per Base Sequence*: O Eixo X Representa a Posição dos Reads e o Eixo Y a Pontuações de Qualidade. Com as Seguintes Cores no Eixo Y – Verde (Leituras com Boa qualidade), Laranja (Leituras com Qualidade Razoável) e Vermelho (Leituras com Baixa Qualidade)



Fonte: Próprio Autor (2021).

Além disso, com a retirada dos adaptadores e sequências de baixa qualidade, realizado pela ferramenta Trim Galore!, obteve-se um total de 337.754.005 de leituras. Essas leituras mapeadas com o genoma de referência apresentaram 94.83% de mapeamento na referência de *A. mellifera*, um número considerável quando comparado ao comprimento total do genoma (225.250.884) (WALLBERG *et al.*, 2019) utilizado como base para este estudo, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Número de Leituras e % de Alinhamentos das Amostras

Corrida	Amostra	Reads	Total de Reads	Alinhamento (%)	Média de Reads mapeados (%)
SRR8297881	Cipermetrina 3 ng	26.930.238		95.36%	
SRR8297884	Cipermetrina 3 ng	29.409.790		95.24%	
SRR8297885	Cipermetrina 3 ng	29.532.338		95.59%	
SRR8297890	Cipermetrina 3 ng	23.004.925		94.75%	
SRR8297886	Cipermetrina 0,3 ng	24.097.081		95.01%	
SRR8297887	Cipermetrina 0,3 ng	61.139.382	337.754.005	94.88%	94.83%
SRR8297888	Cipermetrina 0,3 ng	30.767.394		94.22%	
SRR8297889	Cipermetrina 0,3 ng	21.854.076		94.84%	
SRR8297880	Cipermetrina 0,3 ng	25.150.117		93.23%	
SRR8297891	Controle	22.772.319		95.04%	
SRR8297882	Controle	31.150.913		94.61%	
SRR8297883	Controle	11.945.432		95.14%	

Fonte: Próprio Autor (2021).

5.2 Análise de Expressão Diferencial

Para avaliar o perfil de expressão dos transcritos (mRNAs e lncRNAs) foi analisada a expressão diferencial assumindo suporte estatístico de $FDR \leq 0.05$, onde identificou-se o perfil de expressão de 50 mRNAs e 21 lncRNAs no grupo de cipermetrina na concentração de 3 ng, enquanto em cipermetrina a 0,3 ng foram identificados somente 9 mRNAs e 2 lncRNAs. Em vista disso, foi observado que o grupo de cipermetrina 0,3 ng comparado ao controle não apresentou diferença estatística.

Com base nisso, sugere-se que cipermetrina nessa dosagem não afeta o transcriptoma de *A. mellifera*. Observações semelhantes foram vistas por Fent, Schmid e Christen (2020), em abordagem com montagem *de novo* (mapeamento entre os *reads* da biblioteca sem o genoma de referência) identificaram apenas 38 genes diferencialmente expressos. É importante ressaltar que no presente trabalho, optou-se pelo mapeamento dos *reads* na referência de *A. mellifera*, que por sua vez apresenta variação genômica comparado ao transcriptoma de *Apis* analisado pelos autores (FENT; SCHMID; CHRISTEN, 2020). Isso justifica o mapeamento de *reads* de aproximadamente 95%, conforme apresentado na Tabela 5.

Dessa forma, levando em consideração o número de mRNAs (cerca de 9.944) e lncRNAs (cerca de 1.858) anotados na referência de *A. mellifera* depositados no banco de dados ENSEMBL (WALLBERG *et al.*, 2019). Desse modo, observou-se uma pequena parcela de RNAs foram diferencialmente expressos, mesmo na alta dosagem de cipermetrina (3 ng).

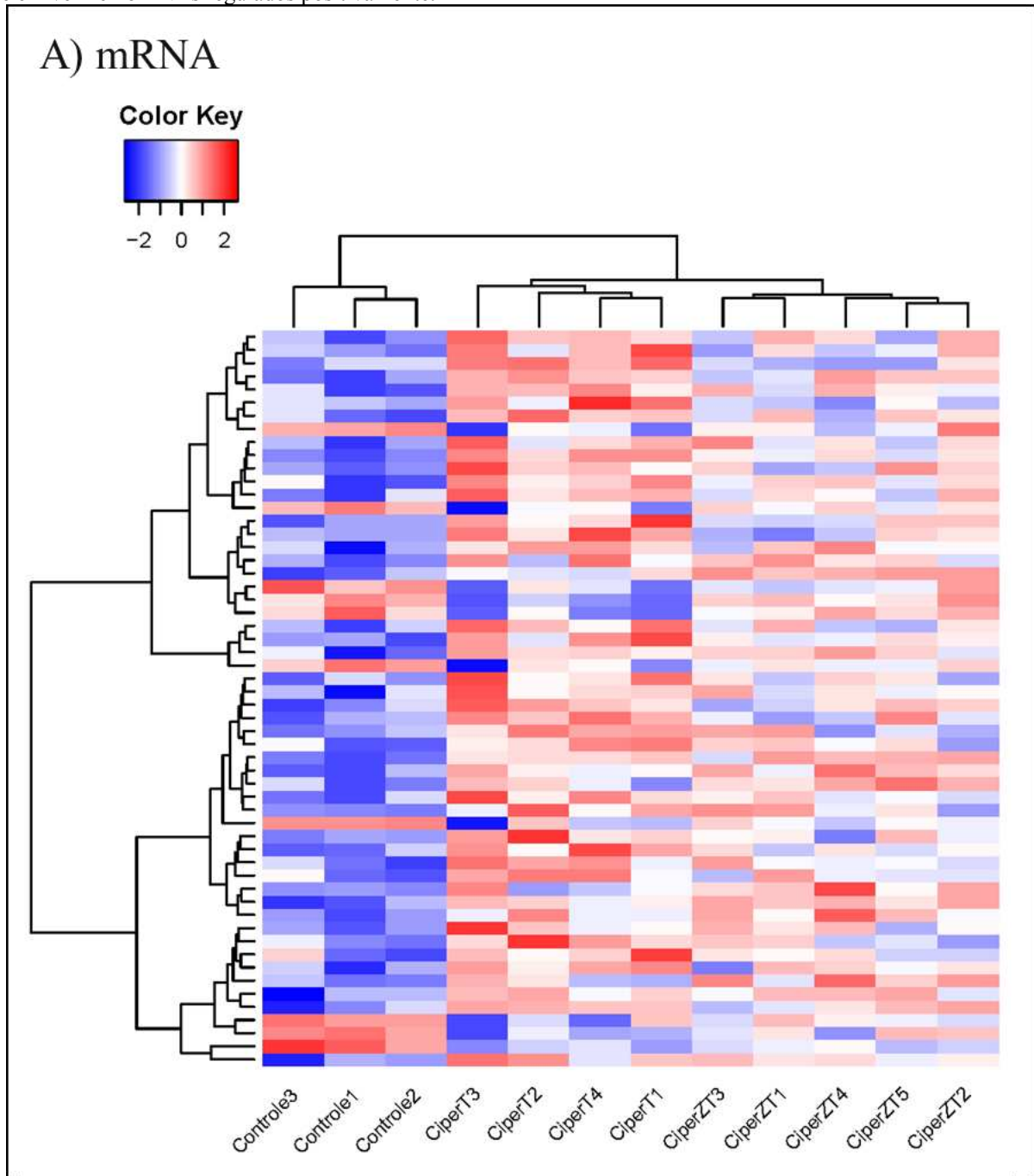
O baixo número tanto de mRNAs quanto lncRNAs diferencialmente expressos pode ser explicado pelo material coletado (tecido cerebral) ou pelo tempo de exposição ao tratamento

com cipermetrina (48 horas) (FENT; SCHMID; CHRISTEN, 2020). No entanto, observações semelhantes foram documentadas por Vedelek *et al.* (2018) ao analisar o tecido testicular de *Drosophila melanogaster*, os autores identificaram uma resposta tecido específica para esses transcritos. Ainda nesse contexto, conforme descrito por Ilott e Ponting (2013), os lncRNAs são menos expressos, o que pode significar na baixa captura dos transcritos durante o preparo de bibliotecas não específicas desses RNAs. Isso justifica a baixa expressão encontrada dessas moléculas em relação aos RNAs codificantes.

Ao analisar o logFC dos lncRNAs e mRNAs diferencialmente expressos em cada um dos grupos amostrais através do *heatmap*, é possível identificar a separação das amostras controle e tratadas (cipermetrina em diferentes concentrações). Além disso, nota-se uma ligeira separação dos grupos de amostras com exposição a cipermetrina (0,3 ng e 3 ng).

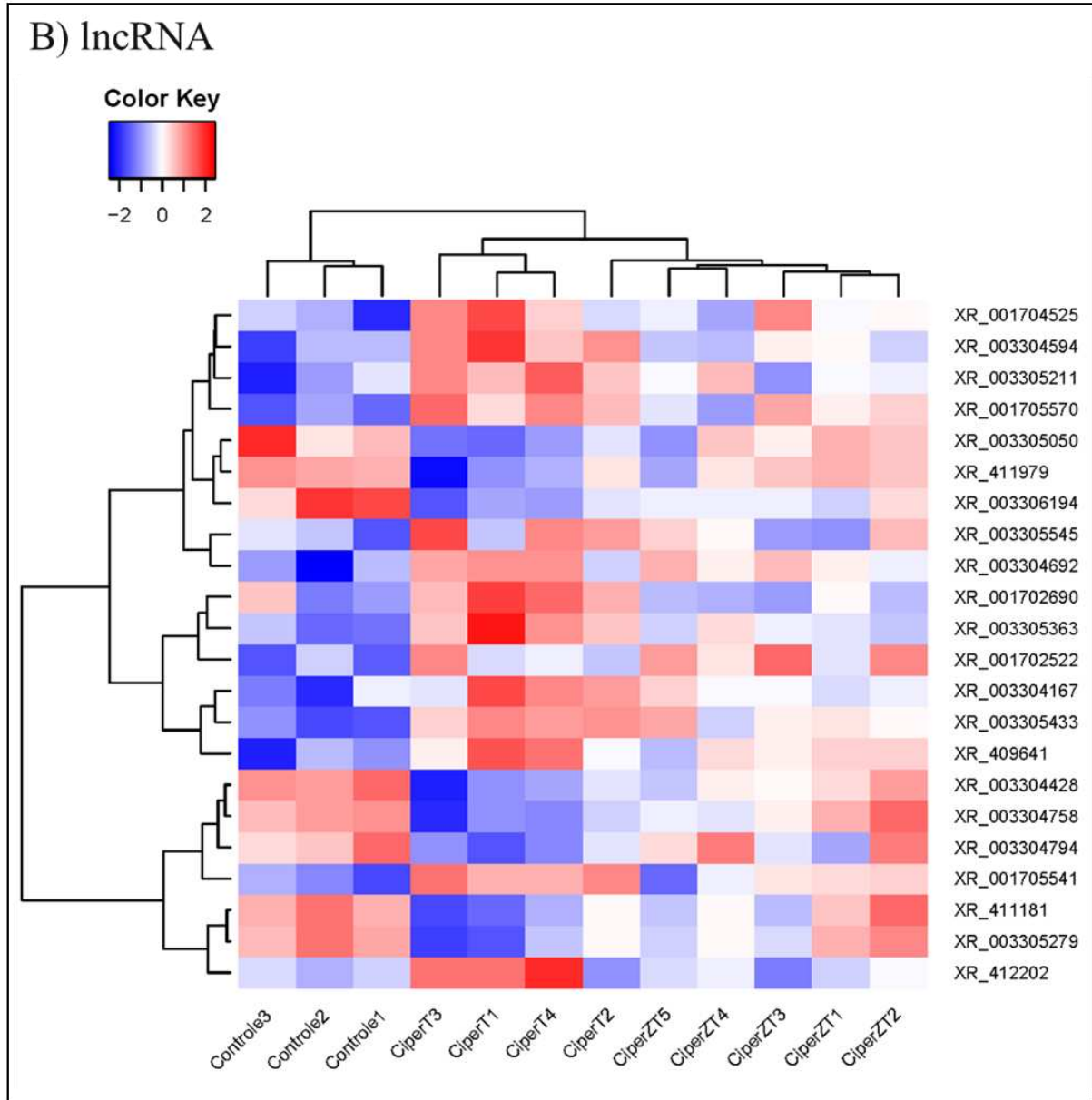
Diante disso, observa-se que parte dos lncRNAs diferencialmente expressos estão regulados positivamente no contraste entre controle e exposição a cipermetrina nas duas condições (0,3 ng e 3 ng), o mesmo padrão foi observado para mRNAs. Embora a formação dos grupos amostrais com os dados de logFC de lncRNAs possa ser visível a separação entre as amostras tratadas e controle, observa-se que não há homogeneidade no perfil de expressão entre as réplicas biológicas de cipermetrina. Isso aumenta as evidências de que o tratamento pode não ser suficiente para induzir e/ou manter o padrão de expressão desses transcritos. A análise do *heatmap* de mRNAs e lncRNAs podem ser visualizadas na Figura 13.a (mRNAs diferencialmente expressos) e Figura 13.b (lncRNAs diferencialmente expressos).

Figura 13.a – *Heatmap* do Perfil de Expressão de mRNAs entre o Grupo Controle, Cipermetrina 0,3 ng (CiperZT) e Cipermetrina 3 ng (CiperT). Transcritos filtrados a partir do FDR < 5% com Valores de Expressão por logFC: *log Fold Change* (logFC), sendo a cor azul representa os RNAs regulados negativamente e em vermelho RNAs regulados positivamente.



Fonte: Próprio Autor (2021).

Figura 13.b – Heatmap do Perfil de Expressão de lncRNAs entre o Grupo Controle, Cipermetrina 0,3 ng (CiperZT) e Cipermetrina 3 ng (CiperT): Transcritos filtrados a partir do FDR < 5% com Valores de Expressão por logFC.



Fonte: Próprio Autor (2021).

5.3 Análise da Rede de Co-Expressão e Enriquecimento de Via

No intuito de identificar possíveis relações de lncRNAs com mRNAs, foram utilizados os dados de amostras de abelhas expostas a cipermetrina 3 ng, sendo estes os que apresentaram resultados significativos. Isso é, um número maior de lncRNA diferencialmente expressos. Com isso, através da análise de correlação, metodologia proposta por Contreras-López *et al.* 2018, foi assumido o suporte estatístico de $\log_2FC > 0.9$ e $p\text{-value}$ ajustado ≤ 0.01 , foram identificados 6 lncRNAs diferencialmente expressos correlacionados aos RNAs codificantes, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – O nível de Correlação dos lncRNAs e seus Alvos: Dados Gerados a partir do Pacote EBseq e psych Conforme os Parâmetros de $\log_2FC > 0.9$ e p -value ajustado ≤ 0.01 .

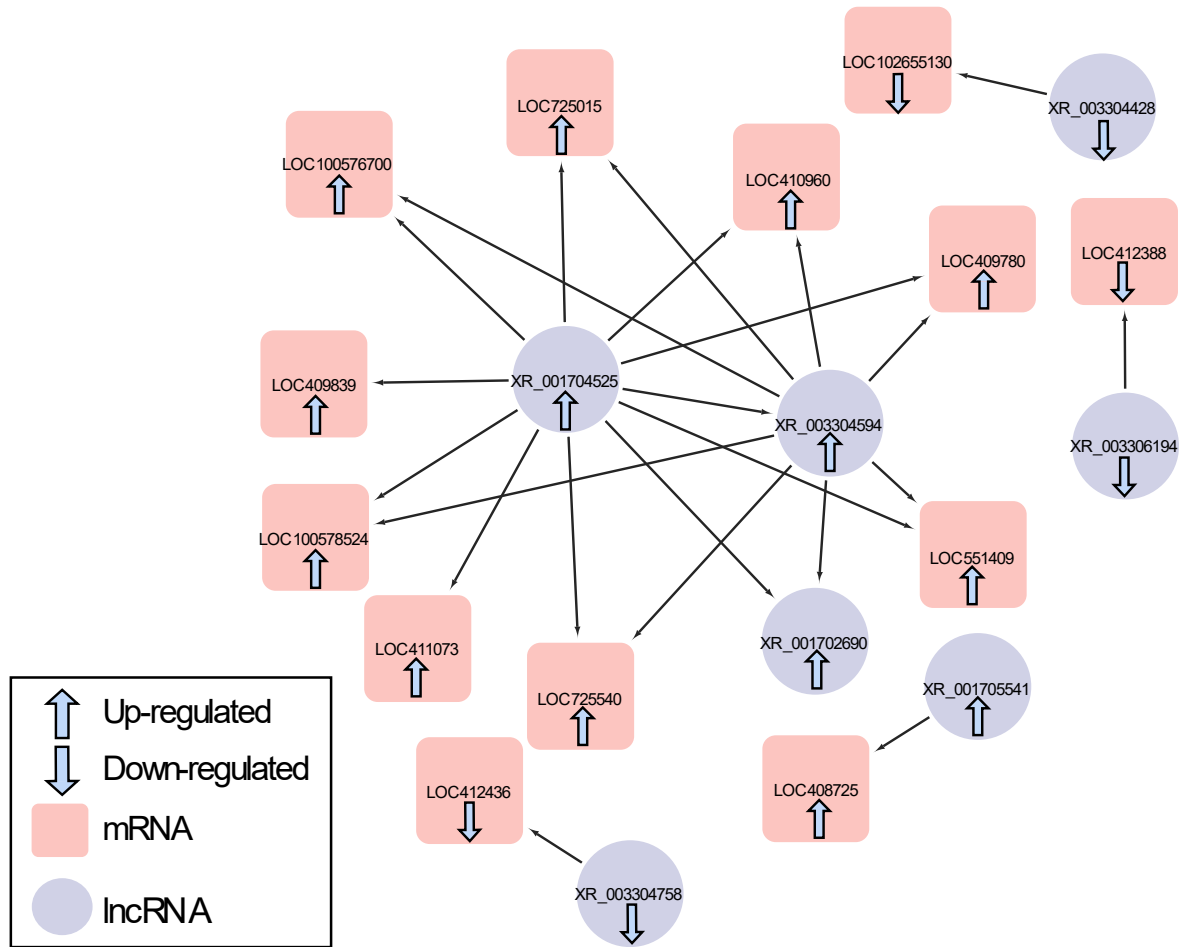
lncRNA	Alvo (mRNA e lncRNA)	Correlação
	XR_003304594	0.999965664
	XR_001702690	0.99980202
	LOC551409	0.999824595
	LOC725015	0.999805908
	LOC100576700	0.999925131
XR_001704525	LOC725540	0.999938258
	LOC411073	0.99986821
	LOC409780	0.999804046
	LOC409839	0.999856237
	LOC100578524	0.999963729
	LOC410960	0.999909064
XR_001705541	LOC408725	0.999990536
XR_003304428	LOC102655130	0.999924619
	XR_001702690	0.99993155
	LOC551409	0.999798073
	LOC725015	0.999809448
	LOC100576700	0.999866448
XR_003304594	LOC725540	0.999831897
	LOC409780	0.999850522
	LOC100578524	0.999873369
	LOC410960	0.999793057
XR_003304758	LOC412436	0.999970326
XR_003306194	LOC412388	0.999854736

Fonte: Próprio Autor (2021).

Foi identificado que o lncRNA XR_001704525 regulado positivamente ($\log_2FC = 1.106$ e $FDR > 0.05$) está correlacionado a 9 mRNAs regulados positivamente, sugerindo uma relação de *feedback* positivo. Isso é, possivelmente esses transcritos estejam interagindo para atuar em um mesmo processo biológico.

Além disso, o mesmo lncRNA XR_001704525 em conjunto com outro lncRNA XR_003304594 ($\log_2FC = 1.134$ e $FDR > 0.05$) se correlacionaram ao lncRNA XR_001702690 regulado positivamente ($\log_2FC = 1.214$ e $FDR > 0.05$). Estes RNAs estão inclusos em um grupo complexo de interação de lncRNA-mRNA (Figura 14). Contudo, não foi possível determinar a interação do lncRNA XR_001702690 com outros RNAs alvos.

Figura 14 – Rede de Co-Expressão de interação de mRNAs e lncRNAs do Tratamento de Cipermetrina 3 ng a partir do $\log_2FC > 0.9$ e $p\text{-value ajustado} \leq 0.01$



Fonte: Próprio Autor (2021).

Para analisar o processo biológico em que os lncRNAs estavam associados, foi realizada a busca de anotações KEGG e GO (*Gene Ontology*) dos mRNAs da interação. Dessa forma, foram identificados que os lncRNAs estão associados, principalmente a genes da via de metabolismo de mRNA.

Complementar a essa observação foram identificados lncRNAs associados a mRNA de genes que participam de processos de transporte transmembrana (GO:0055085) e decaimento do processo catabólico do mRNA transcrito nuclearmente mediado por *nonsense* (GO:0000184). Esse último está envolvido na degradação de RNAs mensageiros que contém códons que provocam a parada prematura da leitura durante a tradução (KARAMYSHEV; KARAMYSHEVA, 2018; ATTRILL *et al.*, 2019). Ao degradar estes mRNAs, ocorre o impedimento da produção de proteínas truncadas (ATTRILL *et al.*, 2019). Este mecanismo, de acordo com Amaral (2016), é altamente conservado entre os eucariotos. Para o mesmo autor,

sem este mecanismo poderia produzir proteínas que poderiam interferir no mecanismo natural da célula, embora existam poucas evidências da mecanística do processo (AMARAL, 2016).

Além destas observações foram verificados que os RNAs estão associados a degradação de mRNA (KEGG:03018) e no mecanismo de vigilância de mRNA (KEGG:03015), possivelmente para manter a integridade das células. Visto que, para Frischmeyer *et al.* (2002) e Laffleur e Basu (2019) o mecanismo de vigilância de mRNAs é um processo importante para manter a estabilidade e proteção das células contra erros na tradução. Além disso, para Karamyshev *et al.* (2018) esse processo inicia-se no núcleo da célula. Os mesmos mecanismos foram identificados por Huang *et al.* (2021), na atuação de mRNAs e lncRNAs em cérebro de abelhas expostas ao inseticida dinotefurano. Com base neste estudo, a análise de enriquecimento funcional pode ser analisada na Tabela 7.

Tabela 7 – Análise de Enriquecimento Funcional com KEGG e Gene Ontology do Processo Biológico dos Transcritos do Grupo de Cipermetrina 3 ng com base nos IDs

ID	Term
KEGG:04320	Dorso-ventral axis formation
KEGG:03013	RNA transport
KEGG:03015	mRNA surveillance pathway
KEGG:03018	RNA degradation
GO:0008150	biological_process
GO:0055085	transmembrane transport
GO:0006402	mRNA catabolic process
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay

Fonte: Próprio Autor (2021).

Para ampliar as informações obtidas até o momento, esses mRNAs foram comparados no banco de dados UNIPROT (CONSORTIUM, 2018) a partir do ID. Com base nos resultados anteriores, os genes codificantes observados no presente estudo estão associados ao metabolismo de RNAs. Diante desse contexto, o mesmo foi observado no gene LOC100576700, codificante da proteína bHLH (*basic helix-loop-helix protein*). Proteína a qual está envolvida na regulação dos precursores das células oligodendríticas em *Drosophila melanogaster* (MOORE *et al.*, 2000).

5.4 Localização Subcelular dos lncRNAs Diferencialmente Expressos

A fim de compreender os possíveis locais de atuação dos lncRNAs, foi realizada análise e predição da localização subcelular dessas moléculas. Possivelmente grande parte desses

lncRNAs são direcionados aos compartimentos celulares principalmente no núcleo e citoplasma, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Localização Subcelular de lncRNAs Diferencialmente Expressos (FDR < 0.05) Correlacionados a Genes ($\log_2FC > 0.9$ e $p\text{-value ajustado} \leq 0.01$)

lncRNA	Localização Subcelular
XR_001704525	Núcleo
XR_003304594	Citoplasma
XR_001705541	Citoplasma
XR_003304428	Exossomo
XR_003306194	Núcleo
XR_001702690	Citoplasma
XR_003304758	Núcleo

Fonte: Próprio Autor (2021).

Sugere-se que tais lncRNAs possam estar atuando na transcrição desses mRNAs, visto que, conforme Gao *et al.* (2020) os RNAs longos que atuam no núcleo podem estar associados com o processo de metilação do DNA, bem como na regulação da transcrição de genes codificantes através da interação com fatores de transcrição. Essas observações condizem com os dados obtidos nesse trabalho.

Nesse sentido, possivelmente o lncRNA XR_001704525 esteja regulando a expressão de outros mRNAs e lncRNAs no núcleo da célula através de um *feedback* positivo. Enquanto, os lncRNAs encontrados nesse estudo, situados no citoplasma, podem estar atuando na estabilidade dos mRNAs e/ou proteínas, conforme descrito por Gao *et al.* (2020). No entanto, estudos futuros devem ser realizados para compreender os mecanismos de atuação desses transcritos e validação da localização subcelular desses transcritos.

6 CONCLUSÃO

Observou-se que a cipermetrina 3 ng afeta a expressão de lncRNAs em abelhas expostas a este inseticida, onde o pipeline de análise proposto foi suficiente para identificá-los. As evidências levantadas nesse estudo com lncRNAs sugere que os transcritos diferencialmente expressos em abelhas expostas a cipermetrina a 3 ng, podem estar atuando em vias importantes no mecanismo de metabolismo basal de mRNAs, tal como o processo catabólico de mRNA. Além disso, sugere que os lncRNAs estão em diferentes compartimentos nas células, especialmente no núcleo e citoplasma.

Apesar dessas previsões, são necessários novos estudos para compreender a atuação dessas moléculas. Sugere-se a busca do mecanismo de ação por meio de análises *in silico* e laboratoriais para compreender a atuação dessas moléculas em abelhas exposta a agrotóxicos, interação lncRNA-proteína e mecanismo de regulação (*cis* e *trans*) com mRNAs.

Dessa forma, estudos futuros poderão contribuir acerca do entendimento do processo biológicos em abelhas expostas a agrotóxicos, a fim de contribuir no avanço tecnológico da apicultura. Bem como, auxiliar no melhoramento genético, visto que, a análise de transcriptoma poderá agregar com informações inerente aos efeitos ambientais e a interação deste com os efeitos genéticos para os processos de seleção de características de interesse zootécnico.

REFERÊNCIAS

A STEINHAEUER, Nathalie *et al.* A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the bee informed partnership. **Journal Of Apicultural Research**, [S.I.], v. 53, n. 1, p. 1-18, jan. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.53.1.01>.

ABEMEL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL. **Dados Estatísticos do Mercado de Mel**: janeiro a outubro de 2020. Janeiro a Outubro de 2020. 2020. Disponível em: <https://brazilletsbee.com.br/default.aspx>. Acesso em: 16 fev. 2021.

ABERNATHY, Jason *et al.* Integrative functional analyses using rainbow trout selected for tolerance to plant diets reveal nutrigenomic signatures for soy utilization without the concurrence of enteritis. **Plos One**, [S.I.], v. 12, n. 7, 19 jul. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0180972>.

AFGAN, Enis *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 46, n. 1, p. 537-544, 22 maio 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky379>.

AFGAN, Enis *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 44, n. 1, p. 3-10, 2 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw343>.

AFGAN, Enis *et al.* Genomics Virtual Laboratory: a practical bioinformatics workbench for the cloud. **Plos One**, [S.I.], v. 10, n. 10, p. 1-1, 26 out. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140829>.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1427p.

ALMEIDA, Gesline Fernandes de. **Fatores que interferem no comportamento enxameatório de abelhas africanizadas**. 2008. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**, [S.I.], v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).

AMARAL, Gerson Leonel Asper. **MRNA Metabolism: Nonsense Mediated mRNA Decay as a Tool for Gene Therapy and the Role of Human DIS3L2 in Transcript Degradation**. 2016. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Humana e Ambiente, Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

AMENT, S. A. *et al.* Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 105, n. 11, p. 4226-4231, 12 mar. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0800630105>.

ANAND, Lakshay; LOPEZ, Carlos M. Rodriguez. ChromoMap: an r package for interactive visualization and annotation of chromosomes. **Biorxiv**, [S.I.], 11 abr. 2019. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/605600>.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W.. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 31, n. 2, p. 166-169, 25 set. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.

ANDREWS, S. **FastQC**: about a quality control analysis tool for high throughput sequencing data. About A quality control analysis tool for high throughput sequencing data. 2010. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 21 mar. 2021.

ARRUDA, Vanilda Aparecida Soares de. **Pólen apícola desidratado**: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica. 2013. 202 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ASHBY, Regan *et al.* MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 6, n. 1, 7 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep18794>.

ASSIS, Tairine Lenita de Oliveira. **PESO E MORFOMETRIA DA RAINHA COMO CRITÉRIOS DE SELEÇÃO INDIRETA EM ABELHAS AFRICANIZADAS**. 2017. 30 f. TCC (Graduação) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, 2017.

ATTRILL, Helen *et al.* Annotation of gene product function from high-throughput studies using the Gene Ontology. **Database**, [s. l.], v. 2019, p. 1-8, fev. 2019.

BACKOFEN, Rolf *et al.* RNA-bioinformatics: tools, services and databases for the analysis of rna-based regulation. **Journal Of Biotechnology**, [S.I.], v. 261, p. 76-84, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.019>.

BADAoui, Bouabid *et al.* RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. **Plos One**, [S.I.], v. 12, n. 3, p. 0-0, 28 mar. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0173438>.

BAIRD, Colin; CANN, Michael. **Química ambiental**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.

BAO, Weidong; KOJIMA, Kenji K.; KOHANY, Oleksiy. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. **Mobile Dna**, [S.I.], v. 6, n. 11, 2 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13100-015-0041-9>.

BATUT, Bérénice *et al.* Community-Driven Data Analysis Training for Biology. **Cell Systems**, [S.I.], v. 6, n. 6, p. 752-758, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cels.2018.05.012>.

BATUT, Bérénice *et al.* ASaiM: a galaxy-based framework to analyze microbiota data. **Gigascience**, [S.I.], v. 7, n. 6, 15 maio 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gigascience/giy057>.

BAYAT, A.. Science, medicine, and the future: bioinformatics. **Bmj**, [S.I.], v. 324, n. 7344, p. 1018-1022, 27 abr. 2002. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.324.7344.1018>.

BEHURA, S. K.; WHITFIELD, C. W.. Correlated expression patterns of microRNA genes with age-dependent behavioural changes in honeybee. **Insect Molecular Biology**, [S.I.], p. 0-0, jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01010.x>.

BELLUCCI, Matteo *et al.* Predicting protein associations with long noncoding RNAs. **Nat Methods**, [S.I.], v. 8, n. 6, p. 444-445, jun. 2011.

BENSON, Dennis A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 41, n. 1, p. 36-42, 26 nov. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>.

BERGHOFF, E. G. *et al.* Evf2 (Dlx6as) lncRNA regulates ultraconserved enhancer methylation and the differential transcriptional control of adjacent genes. **Development**, [S.I.], v. 140, n. 21, p. 4407-4416, 2 out. 2013. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.099390>.

BHAN, Arunoday; SOLEIMANI, Milad; MANDAL, Subhrangsu S.. Long Noncoding RNA and Cancer: a new paradigm. **Cancer Research**, [S.I.], v. 77, n. 15, p. 3965-3981, 12 jul. 2017. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-2634>.

BHARGAVA, Maneesh *et al.* Bronchoalveolar Lavage Fluid Protein Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome Provides Insights into Pathways Activated in Subjects with Different Outcomes. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 00-0, 7 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07791-8>.

BIENEFELD, Kaspar; EHRHARDT, Klaus; REINHARDT, Friedrich. Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects – A BLUP-Animal Model approach. **Apidologie**, [S.I.], v. 38, n. 1, p. 77-85, 15 dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2006050>.

BINDEA, Gabriela *et al.* ClueGO: a cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 25, n. 8, p. 1091-1093, 23 fev. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>.

BLANKENBERG, Daniel *et al.* Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. **Genome Biology**, [S.I.], v. 15, n. 2, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/gb4161>.

BLOCH, Guy; GROZINGER, Christina M.. Social molecular pathways and the evolution of bee societies. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.I.], v. 366, n. 1574, p. 2155-2170, 27 jul. 2011. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0346>.

BOLAND, C. Richard. Non-coding RNA: it's not junk. **Digestive Diseases And Sciences**, [S.I.], v. 62, n. 5, p. 1107-1109, 7 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-017-4506-1>.

BOMBARDI, Larissa Mies. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: Ffch - Usp, 2017. 296 p.

BRANDT, Annely *et al.* Immunosuppression in Honeybee Queens by the Neonicotinoids Thiocloprid and Clothianidin. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, 5 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-04734-1>.

BRENNECKE, Julius *et al.* Bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in Drosophila. **Cell**, [S.I.], v. 113, n. 1, p. 25-36, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00231-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00231-9).

BRODSCHNEIDER, Robert; CRAILSHEIM, Karl. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, [S.I.], v. 41, n. 3, p. 278-294, 21 abr. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010012>.

BYE, Anja *et al.* Circulating MicroRNAs and Aerobic Fitness – The HUNT-Study. **Plos One**, [S.I.], v. 8, n. 2, 28 fev. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057496>.

CALATAYUD-VERNICH, Pau *et al.* Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: assessing beehive exposure. **Environmental Pollution**, [S.I.], v. 241, p. 106-114, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.062>.

CAMARGO, Ricardo Costa Rodrigues de (ed.). **Produção de Mel**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 138 p. (Sistemas de Produção).

CAMARGO, S.C. *et al.* ABELHA RAINHA *Apis mellifera* E A PRODUTIVIDADE DA COLÔNIA. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S.I.], v. 14, n. 4, p. 213-220, 11 dez. 2015. Revista Scientia Agraria Paranaensis (SAP). <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v14n4p213-220>.

CAN, Tolga. Introduction to Bioinformatics. **Mirnomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis**, [S.I.], p. 51-71, 11 nov. 2013. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8_4.

CARNEIRO, Fernando Ferreira *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Epsjv; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CARRIERI, Claudia *et al.* Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. **Nature**, [S.I.], v. 491, n. 7424, p. 454-457, 14 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11508>.

CERQUEIRA, Amanda; FIGUEIREDO, Rodolfo Antônio. Percepção ambiental de apicultores: desafios do atual cenário apícola no interior de são paulo. **Acta Brasiliensis**,

[S.I.], v. 1, n. 3, p. 17-21, 26 set. 2017. *Acta Brasiliensis*.
<http://dx.doi.org/10.22571/actabra13201754>.

CHAMBEYRON, S. *et al.* PiRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposon transcripts in the *Drosophila* female germline. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 105, n. 39, p. 14964-14969, 22 set. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0805943105>.

CHEN, Dafu *et al.* Genome-Wide Identification of Long Non-Coding RNAs and Their Regulatory Networks Involved in *Apis mellifera ligustica* Response to *Nosema ceranae* Infection. **Insects**, [S.I.], v. 10, n. 8, 9 ago. 2019. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/insects10080245>.

CHEN, Runsheng. On Bioinformatic Resources. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 1-3, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.002>.

CHEN, Yunshun. **EdgeR: differential analysis of sequence read count data**. 2020.
 Disponível em:
<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/edgeR/inst/doc/edgeRUsersGuide.pdf>.
 Acesso em: 3 abr. 2021.

CHENG, Jun-Ting *et al.* Insights into Biological Role of LncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition. **Cells**, [S.I.], v. 8, n. 10, 30 set. 2019. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/cells8101178>.

CHMIEL, John A. *et al.* Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: a role for probiotics as mediators of environmental stress. **Frontiers In Ecology And Evolution**, [S.I.], v. 8, 19 fev. 2020. Frontiers Media SA.
<http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2020.00022>.

CLOONAN, Nicole *et al.* Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature Methods**, [S.I.], v. 5, n. 7, p. 613-619, 30 maio 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1223>.

COBEY, Susan W.; SHEPPARD, Walter S.; TARPY, David R.. Status of Breeding Practices and Genetic Diversity in Domestic U.S. Honey Bees. In: SAMMATARO, Diana; YODER, Jay A. (ed.). **Honey Bee Colony Health**. Boca Raton: Crc Press, 2012. Cap. 4. p. 39-53.

COKUS, Shawn J. *et al.* Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. **Nature**, [S.I.], v. 452, n. 7184, p. 215-219, 17 fev. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06745>.

CONESA, Ana *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, [S.I.], v. 17, n. 13, 26 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s13059-016-0881-8>.

CONNOLLY, Christopher. The risk of insecticides to pollinating insects. **Communicative & Integrative Biology**, [S.I.], v. 6, n. 5, 21 set. 2013. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.4161/cib.25074>.

CONTRERAS-LÓPEZ, Orlando *et al.* Step-by-Step Construction of Gene Co-expression Networks from High-Throughput Arabidopsis RNA Sequencing Data. **Methods In Molecular Biology**, [S.I.], p. 275-301, 2018. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5_21.

CONSORTIUM, The Rnacentral. RNAcentral: a hub of information for non-coding rna sequences. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 47, n. 1, p. 221-229, 5 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1034>.

CONSORTIUM, The Uniprot. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 47, n. 1, p. 506-515, 5 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1049>.

COSTA-MAIA, Fabiana Martins *et al.* Estimates of covariance components for hygienic behavior in Africanized honeybees (*Apis mellifera*). **R. Bras. Zootec.**, [S.I.], v. 40, n. 9, p. 1909-1916, 2011.

COSTA-SILVA, Juliana; DOMINGUES, Douglas; LOPES, Fabricio Martins. RNA-Seq differential expression analysis: an extended review and a software tool. **Plos One**, [S.I.], v. 12, n. 12, 21 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>.

COX, Siân Se *et al.* Evidence from bioinformatics, expression and inhibition studies of phosphoinositide-3 kinase signalling in *Giardia intestinalis*. **Bmc Microbiology**, [S.I.], v. 6, n. 45, 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-45>.

COX-FOSTER, D. L. *et al.* A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Science**, [S.I.], v. 318, n. 5848, p. 283-287, 12 out. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146498>.

CUI, Tianyu *et al.* RNALocate v2.0: an updated resource for rna subcellular localization with increased coverage and annotation. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], p. 1-7, 22 set. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab825>.

CRISTINO, Alexandre S. *et al.* Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. **Nature Communications**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 0-0, 20 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6529>.

DEGRANDI-HOFFMAN, Gloria; CHEN, Yanping; SIMONDS, Roger. The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, [S.I.], v. 4, n. 1, p. 71-89, 4 jan. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/insects4010071>.

DERECKA, Kamila *et al.* Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae. **Plos One**, [S.I.], v. 8, n. 7, 2 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068191>.

DERRIEN, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. : Analysis of their gene structure, evolution,

and expression. **Genome Research**, [S. I.], v. 22, n. 9, p. 1775-1789, 1 set. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.132159.111>.

DOUBLET, Vincent *et al.* Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. **Environmental Microbiology**, [S.I.], v. 17, n. 4, p. 969-983, 11 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12426>.

ELISENS, Wayne J.; FREEMAN, C. Edward. FLORAL NECTAR SUGAR COMPOSITION AND POLLINATOR TYPE AMONG NEW WORLD GENERA IN TRIBE ANTIRRHINEAE (SCROPHULARIACEAE). **American Journal Of Botany**, [S.I.], v. 75, n. 7, p. 971-978, jul. 1988. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb08802.x>.

ETEBARI, Kayvan; FURLONG, Michael J.; ASGARI, Sassan. Genome wide discovery of long intergenic non-coding RNAs in Diamondback moth (*Plutella xylostella*) and their expression in insecticide resistant strains. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 5, n. 1, 28 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14642>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe**. **Efsa Journal**, [S.I.], v. 10, n. 6, jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2752>.

EVANS, J. D.; WHEELER, D. E.. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 96, n. 10, p. 5575-5580, 11 maio 1999. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.10.5575>.

FANG, Yiwen; FULLWOOD, Melissa J.. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S. I.], v. 14, n. 1, p. 42-54, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.006>.

FAQUINELLO, Patrícia *et al.* Parameters for Royal Jelly Production in Africanized Honeybees. **Sociobiology**, [S.I.], v. 57, n. 3, p. 495-509, 2011.

FARINA, Walter M. *et al.* Effects of the Herbicide Glyphosate on Honey Bee Sensory and Cognitive Abilities: individual impairments with implications for the hive. **Insects**, [S.I.], v. 10, n. 10, p. 1-16, 18 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/insects10100354>.

FENT, Karl; SCHMID, Michael; CHRISTEN, Verena. Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution**, [S.I.], v. 259, p. 113715, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113715>.

FERNÁNDEZ-SUÁREZ, Xosé M.; RIGDEN, Daniel J.; GALPERIN, Michael Y.. The 2014 Nucleic Acids Research Database Issue and an updated NAR online Molecular Biology Database Collection. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 42, n. 1, 6 dez. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1282>.

FEYEREISEN, Rene. INSECT P450 ENZYMES. In: GILBERT, Lawrence I.; IATROU, Kostas; GILL, Sarjeet S. (ed.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. [S.I.]: Elsevier, 2005. p. 507-533.

FISHER, Adrian; RANGEL, Juliana. Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. **Plos One**, [S.I.], v. 13, n. 12, 13 dez. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0208630>.

FONSECA, Larissa Fernanda Simielli *et al.* Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 18, n. 1, p. 0-0, dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-4323-0>.

FRISCHMEYER, Pamela A. *et al.* An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. **Science**, [S.I.], v. 295, p. 2258-2261, 22 mar. 2002.

FU, Xiang-Dong. Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. **National Science Review**, [S.I.], v. 1, n. 2, p. 190-204, 14 maio 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nsr/nwu008>.

GAJGER, Ivana Tlak; SAKAČ, Martina; GREGORC, Aleš. Impact of Thiamethoxam on Honey Bee Queen (*Apis mellifera carnica*) Reproductive Morphology and Physiology. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.I.], v. 99, n. 3, p. 297-302, 26 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-017-2144-0>.

GALLO, Domingos *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GAO, Na *et al.* Long Non-Coding RNAs: The Regulatory Mechanisms, Research Strategies, and Future Directions in Cancers. **Frontiers In Oncology**, [S.I.], v. 10, p. 1, 2020.

GARCIA, Regina Conceição *et al.* Honey and propolis production, hygiene and defense behaviors of two generations of Africanized honey bees. **Sci. Agric.**, [S.I.], v. 70, n. 2, p. 74-81, 2013.

GARCIA-AMOEDO, Luis Henrique; ALMEIDA-MURADIAN, Ligia Bicudo de. Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. **Química Nova**, [S.I.], v. 30, n. 2, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000200002>.

GAUTHIER, Jeff *et al.* A brief history of bioinformatics. **Briefings In Bioinformatics**, [S.I.], v. 20, n. 6, p. 1981-1996, 3 ago. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bby063>.

GHOSH, Mrinmoy *et al.* An integrated in silico approach for functional and structural impact of non-synonymous SNPs in the MYH1 gene in Jeju Native Pigs. **Bmc Genetics**, [S.I.], v. 17, n. 1, 4 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-016-0341-1>.

GIANNINI, T. C. *et al.* The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal Of Economic Entomology**, [S.I.], v. 108, n. 3, p. 849-857, 3 maio 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov093>.

GIURFA, Martin *et al.* The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. **Nature**, [S.I.], v. 410, n. 6831, p. 930-933, abr. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35073582>.

GOECKS, Jeremy *et al.* Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, [S.I.], v. 11, n. 8, 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-8-r86>.

GONG, Youhui; DIAO, Qingyun. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. **Ecotoxicology**, [S.I.], v. 26, n. 1, p. 1-12, 7 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-016-1742-7>.

GOODSTADT, Leo. Ruffus: a lightweight python library for computational pipelines. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 26, n. 21, p. 2778-2779, 16 set. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq524>.

GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, [S.I.], v. 347, n. 6229, 26 fev. 2015. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1255957>.

GREHL, Claudius *et al.* How to Design a Whole-Genome Bisulfite Sequencing Experiment. **Epigenomes**, [S.I.], v. 2, n. 4, 11 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/epigenomes2040021>.

GROZINGER, Christina M.; ZAYED, Amro. Improving bee health through genomics. **Nature Reviews Genetics**, [S.I.], v. 21, n. 5, p. 277-291, 25 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-020-0216-1>.

GUO, Xiangqian *et al.* Recipe for a Busy Bee: micrnas in honey bee caste determination. **Plos One**, [S.I.], v. 8, n. 12, 11 dez. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081661>.

GUTSCHNER, Tony; DIEDERICHS, Sven. The hallmarks of cancer. **Rna Biology**, [S.I.], v. 9, n. 6, p. 703-719, jun. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.20481>.

GUTTMAN, Mitchell *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, [S.I.], v. 458, n. 7235, p. 223-227, 1 fev. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07672>.

HADJICHARALAMBOUS; LINDSAY. Long Non-Coding RNAs and the Innate Immune Response. **Non-coding Rna**, [S.I.], v. 5, n. 2, 19 abr. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ncrna5020034>.

HALAK, André Luiz. **PARÂMETROS E CORRELAÇÕES GENÉTICAS E FENOTÍPICAS PARA PESO E MEDIDAS MORFOMÉTRICAS EM RAINHAS Apis**

mellifera AFRICANIZADAS. 2012. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

HALWACHS, Bettina *et al.* Critical Issues in Mycobiota Analysis. **Frontiers In Microbiology**, [S.I.], v. 8, 14 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00180>.

HANEL, Samoel Nicolau. **PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DO MEL NAS ILHAS DO RIO PARANÁ: GESTÃO, TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO MEL**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento Rural Sustentável, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2016.

HAYDAK, Mykola H.. Honey Bee Nutrition. **Annual Review Of Entomology**, [S.I.], v. 15, n. 1, p. 143-156, jan. 1970. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.15.010170.001043>.

HOWE, Kevin L *et al.* Ensembl Genomes 2020—enabling non-vertebrate genomic research. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 689-695, 10 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz890>.

HOWE, S. R.; DIMICK, P. S.; BENTON, A. W.. Composition of Freshly Harvested and Commercial Royal Jelly. **Journal Of Apicultural Research**, [S.I.], v. 24, n. 1, p. 52-61, jan. 1985. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1985.11100649>.

HUANG, Minjie *et al.* Identification of long noncoding RNAs reveals the effects of dinotefuran on the brain in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 22, n. 502, p. 1-13, 2021.

HUMANN, Fernanda C.; TIBERIO, Gustavo J.; HARTFELDER, Klaus. Sequence and Expression Characteristics of Long Noncoding RNAs in Honey Bee Caste Development – Potential Novel Regulators for Transgressive Ovary Size. **Plos One**, [S.I.], v. 8, n. 10, 31 out. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078915>.

ILIK, Ibrahim Avsar *et al.* Tandem Stem-Loops in roX RNAs Act Together to Mediate X Chromosome Dosage Compensation in *Drosophila*. **Molecular Cell**, [S.I.], v. 51, n. 2, p. 156-173, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.001>.

ILOTT, Nicholas E.; PONTING, Chris P.. Predicting long non-coding RNAs using RNA sequencing. **Methods**, [S.I.], v. 63, n. 1, p. 50-59, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.03.019>.

JALILI, Vahid *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 395-402, 1 jun. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa434>.

JAYAKODI, Murukarthick *et al.* Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera*. **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 16, n. 1, 4 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1868-7>.

JOHNSON, Reed M. *et al.* Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). **Plos One**, [S.I.], v. 8, n. 1, 29 jan. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054092>.

JUDD, Walter S. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632 p.

KAMAKURA, Masaki. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, [S.I.], v. 473, n. 7348, p. 478-483, 24 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10093>.

KANEHISA, Minoru *et al.* KEGG: integrating viruses and cellular organisms. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 49, n. 1, p. 545-551, 30 out. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa970>.

KAPRANOV, Philipp *et al.* RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. **Science**, [S.I.], v. 316, n. 5830, p. 1484-1488, 8 jun. 2007. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138341>.

KARAMYSHEV, Andrey L.; KARAMYSHEVA, Zemfira N.. Lost in Translation: Ribosome-Associated mRNA and Protein Quality Controls. **Frontiersin**, [S.I.], v. 9, n. 431, p. 1-13, out. 2018.

KATZ, Yarden *et al.* Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. **Nature Methods**, [S.I.], v. 7, n. 12, p. 1009-1015, 7 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1528>.

KIM, Daehwan *et al.* HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, [S.I.], v. 12, n. 4, p. 357-360, 9 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3317>.

KIYA, Taketoshi *et al.* Identification of kakusei, a Nuclear Non-Coding RNA, as an Immediate Early Gene from the Honeybee, and Its Application for Neuroethological Study. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 13, n. 12, p. 15496-15509, 22 nov. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131215496>.

KLEIN, Alexandra-Maria *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.I.], v. 274, n. 1608, p. 303-313, 27 out. 2006. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.

KNOWLING, Stuart; MORRIS, Kevin V.. Non-coding RNA and antisense RNA. Nature's trash or treasure? **Biochimie**, [S.I.], v. 93, n. 11, p. 1922-1927, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.07.031>.

KOCH, Clarissa M. *et al.* A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology**, [S.I.], v. 59, n. 2, p. 145-157, ago. 2018. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2017-0430tr>.

KODAMA, Y.; SHUMWAY, M.; LEINONEN, R.. The sequence read archive: explosive growth of sequencing data. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 40, n. 1, p. 54-56, 18 out. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr854>.

KOPP, Florian; MENDELL, Joshua T.. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. **Cell**, [S.I.], v. 172, n. 3, p. 393-407, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>.

KÖSTER, Johannes; RAHMANN, Sven. Snakemake - um mecanismo de fluxo de trabalho de bioinformática escalável. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n. 19, p. 2520-2522, 2012.

KOZIOL, Magdalena J; RINN, John L. RNA traffic control of chromatin complexes. **Current Opinion In Genetics & Development**, [S.I.], v. 20, n. 2, p. 142-148, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2010.03.003>.

KRUEGER, Felix. **Trim Galore**. Disponível em: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/. Acesso em: 21 mar. 2021.

KRUPKE, Christian H. *et al.* Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. **Plos One**, [S.I.], v. 7, n. 1, 3 jan. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>.

KUKURBA, Kimberly R.; MONTGOMERY, Stephen B.. RNA Sequencing and Analysis. **Cold Spring Harbor Protocols**, [S.I.], v. 2015, n. 11, p. 951-969, 13 abr. 2015. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.top084970>.

LAFFLEUR, Brice; BASU, Uttiya. Biology of RNA Surveillance in Development and Disease. **Trends Cell Biol.**, [S.I.], v. 29, p. 428-445, 1 maio 2019.

LAMARRE, Sophie *et al.* Optimization of an RNA-Seq Differential Gene Expression Analysis Depending on Biological Replicate Number and Library Size. **Frontiers In Plant Science**, [S.I.], v. 9, n. 108, 14 fev. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00108>.

LEE, Kathleen V. *et al.* A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. **Apidologie**, [S.I.], v. 46, n. 3, p. 292-305, 14 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z>.

LEGEAI, Fabrice; DERRIEN, Thomas. Identification of long non-coding RNAs in insects genomes. **Current Opinion In Insect Science**, [S.I.], v. 7, p. 37-44, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.003>.

LEI, Rex *et al.* Diminishing returns in next-generation sequencing (NGS) transcriptome data. **Gene**, [S.I.], v. 557, n. 1, p. 82-87, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.013>.

LEINONEN, R.; SUGAWARA, H.; SHUMWAY, M.. The Sequence Read Archive. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 39, p. 19-21, 9 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1019>.

- LEIPZIG, Jeremy. A review of bioinformatic pipeline frameworks. **Briefings In Bioinformatics**, [S.I.], 24 mar. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbw020>.
- LENG, Ning *et al.* EBSeq: an empirical bayes hierarchical model for inference in rna-seq experiments. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 29, n. 8, p. 1035-1043, 21 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt087>.
- LERCKER, G. *et al.* Components of Royal Jelly II. The Lipid Fraction, Hydrocarbons and Sterols. **Journal Of Apicultural Research**, [S.I.], v. 21, n. 3, p. 178-184, jan. 1982. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1982.11100538>.
- LI, Dongmei. Statistical Methods for RNA Sequencing Data Analysis. In: HUSI, Holger (ed.). **Computational Biology**. Brisbane: Codon Publications, 2019. p. 85-99.
- LI, Wei Vivian; LI, Jingyi Jessica. Modeling and analysis of RNA-seq data: a review from a statistical perspective. **Quantitative Biology**, [S.I.], v. 6, n. 3, p. 195-209, 10 ago. 2018. Engineering Sciences Press. <http://dx.doi.org/10.1007/s40484-018-0144-7>.
- LIPPOLIS, J.D. *et al.* Symposium review: omics in dairy and animal science.:promise, potential, and pitfalls. **Journal Of Dairy Science**, [S.I.], v. 102, n. 5, p. 4741-4754, maio 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-15267>.
- LIU, Feiling *et al.* Genome-wide identification of long non-coding RNA genes and their association with insecticide resistance and metamorphosis in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 0-0, 20 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16057-2>.
- LV, Yuanda *et al.* Maize transposable elements contribute to long non-coding RNAs that are regulatory hubs for abiotic stress response. **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 20, n. 1, 15 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-6245-5>.
- LORENZ, Ronny *et al.* ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms For Molecular Biology**, [S.I.], v. 6, n. 1, p. 1-14, 24 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>.
- LOWE, Rohan *et al.* Transcriptomics technologies. **Plos Computational Biology**, [S.I.], v. 13, n. 5, p. 0-0, 18 maio 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>.
- MA, Rong; RANGEL, Juliana; GROZINGER, Christina M.. Honey bee (*Apis mellifera*) larval pheromones may regulate gene expression related to foraging task specialization. **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 20, n. 1, 19 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-5923-7>.
- MARCO-PUCHE, Guillermo *et al.* RNA-Seq Perspectives to Improve Clinical Diagnosis. **Frontiers In Genetics**, [S.I.], v. 10, 12 nov. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.01152>.

MARGUERAT, Samuel; BÄHLER, Jürg. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.I.], v. 67, n. 4, p. 569-579, 27 out. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>.

MARTINEZ, Omar Arvey; SOARES, Ademilson Espencer Egea. Melhoria genética na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, [S.I.], v. 13, n. 4, p. 982-990, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-99402012000400006>.

MATTOS, Igor Medici de; SOARES, Ademilson E. E.; TARPY, David R.. Effects of synthetic acaricides on honey bee grooming behavior against the parasitic Varroa destructor mite. **Apidologie**, [S.I.], v. 48, n. 4, p. 483-494, 15 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-017-0491-9>.

MELO, Roseli Freire de *et al.* Pesticidas e seus impactos no ambiente. In: BRITO, Luiza Teixeira de Lima; BRAGA, Marcos Brandao; NASCIMENTO, Tarcizio (ed.). **Impactos ambientais causados pela agricultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. Cap. 4. p. 101-136.

MENZEL, R.. Searching for the Memory Trace in a Mini-Brain, the Honeybee. **Learning & Memory**, [S.I.], v. 8, n. 2, p. 53-62, 1 mar. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.38801>.

MENCK, Carlos F. M.; VAN SLUYS, Marie-Anne. **Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genomas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 528 p.

MEYER, F *et al.* The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **Bmc Bioinformatics**, [S.I.], v. 9, n. 1, 19 set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>.

MITCHELL, Alex L *et al.* MGnify: the microbiome analysis resource in 2020. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 570-578, 7 nov. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz1035>.

MORRIS, John H *et al.* ClusterMaker: a multi-algorithm clustering plugin for cytoscape. **Bmc Bioinformatics**, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 1-1, 9 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-436>.

MOORE, Adrian W. *et al.* A genomewide survey of basic helix–loop–helix factors in Drosophila. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 97, n. 19, p. 10436-10441, nov. 2000.

NABAS, Zaid *et al.* Chemical Composition of Royal Jelly and Effects of Synbiotic with Two Different Locally Isolated Probiotic Strains on Antioxidant Activities. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, [S.I.], v. 64, n. 3, p. 171-180, 30 set. 2014. Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.2478/pjfns-2013-0015>.

NICOLETI, Eduardo Thomé *et al.* CORRELAÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO COM A PRODUÇÃO DE MEL DE COLMEIAS DE APIS MELLIFERA. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 55.; CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 28., 2018, Goiânia. **Zootecnia Brasileira: construindo saberes, formando pessoas e transformando a pecuária nacional.** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia - Sbz e Associação Brasileira dos Zootecnistas, 2018.

NIE, Hongyi *et al.* Identification of genes related to high royal jelly production in the honey bee (*Apis mellifera*) using microarray analysis. **Genetics And Molecular Biology**, [S.I.], v. 40, n. 4, p. 781-789, 2 out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0013>.

OLIVEIRA JUNIOR, José Max Barbosa de; CALVÃO, Lenize Batista (org.). **A Arte de criar Abelhas.** Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. 110 p

OUYANG, Jing *et al.* NRAV, a Long Noncoding RNA, Modulates Antiviral Responses through Suppression of Interferon-Stimulated Gene Transcription. **Cell Host & Microbe**, [S.I.], v. 16, n. 5, p. 616-626, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.001>.

PAPATHEODOROU, Irene *et al.* Expression Atlas update: from tissues to single cells. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 77-83, 30 out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz947>.

PAULI, Andrea; RINN, John L.; SCHIER, Alexander F.. Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. **Nature Reviews Genetics**, [S.I.], v. 12, n. 2, p. 136-149, 18 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2904>.

PEREIRA, Tiago Campos (org.). **Introdução ao universo dos non-coding RNAs.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 219 p.

PIGNATI, Wanderlei Antonio *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a vigilância em saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.I.], v. 22, n. 10, p. 3281-3293, out. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

POBRE, Vânia; ARRAIANO, Cecília M.. Characterizing the Role of Exoribonucleases in the Control of Microbial Gene Expression: differential rna-seq. **Methods In Enzymology**, [S.I.], v. 612, p. 1-24, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2018.08.010>.

PONJAVIC, Jasmina; PONTING, Chris P.. The long and the short of RNA maps. **Bioessays**, [S.I.], v. 29, n. 11, p. 1077-1080, 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20669>.

PORRINI, Claudio *et al.* The Status of Honey Bee Health in Italy: results from the nationwide bee monitoring network. **Plos One**, [S.I.], v. 11, n. 5, p. 0-0, 16 maio 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155411>.

POTTS, Simon G *et al.* Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal Of Apicultural Research**, [S.I.], v. 49, n. 1, p. 15-22, jan. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3896/ibra.1.49.1.02>.

PUNDIR, S. *et al.* An update on the Enzyme Portal: an integrative approach for exploring enzyme knowledge. **Protein Engineering, Design And Selection**, [S.I.], v. 30, n. 3, p. 247-254, 2 fev. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzx008>.

RAMAKRISHNAIAH, Yashpal; KUHLMANN, Levin; TYAGI, Sonika. Computational approaches to functionally annotate long noncoding RNA (lncRNA). **Computers In Biology And Medicine**, [s. l], v. 127, p. 1-34, jun. 2020.

RAVEENDRA, Bindu L. *et al.* Long noncoding RNA GM12371 acts as a transcriptional regulator of synapse function. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s. l], v. 115, n. 43, p. 10197-10205, ago. 2018.

REVELLE W (2021). psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. Northwestern University, Evanston, Illinois. R package version 2.1.9, <https://CRAN.R-project.org/package=psych>.

RICHARD, John Lalith Charles; EICHHORN, Pieter Johan Adam. Deciphering the roles of lncRNAs in breast development and disease. **Oncotarget**, [S.I.], v. 9, n. 28, p. 20179-20212, 28 fev. 2018. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.24591>.

RINDERER, Thomas E.; COLLINS, Anita M.; BROWN, M. A.. HERITABILITIES AND CORRELATIONS OF THE HONEY BEE: response to nosema apis, longevity, and alarm response to isopentyl acetate. **Apidologie**, [S.I.], v. 14, n. 2, p. 79-85, 1983. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19830202>.

RINN, John L. *et al.* Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. **Cell**, [s. l], v. 129, n. 7, p. 1311-1323, jun. 2007.

RISCA, Viviana I.; GREENLEAF, William J.. Beyond the Linear Genome: paired-end sequencing as a biophysical tool. **Trends In Cell Biology**, [S.I.], v. 25, n. 12, p. 716-719, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.004>.

ROBERTS, A. *et al.* Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 27, n. 17, p. 2325-2329, 21 jun. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr355>.

ROBINSON, Gene E.. Regulation of Division of Labor in Insect Societies. **Annual Review Of Entomology**, [S.I.], v. 37, n. 1, p. 637-665, jan. 1992. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K.. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 26, n. 1, p. 139-140, 11 nov. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

ROUZÉ, Régis *et al.* The Honeybee Gut Microbiota Is Altered after Chronic Exposure to Different Families of Insecticides and Infection by Nosema ceranae. **Microbes And Environments**, [S.I.], v. 34, n. 3, p. 226-233, 2019. Japanese Society of Microbial Ecology. <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.me18169>.

SANCHEZ-BAYO, Francisco; GOKA, Koichi. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **Plos One**, [S.I.], v. 9, n. 4, 9 abr. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>.

SANDROCK, Christoph *et al.* Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. **Agricultural And Forest Entomology**, [S.I.], v. 16, n. 2, p. 119-128, 26 dez. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/afe.12041>.

SANTORO, F. *et al.* Imprinted Igf2r silencing depends on continuous Airn lncRNA expression and is not restricted to a developmental window. **Development**, [S.I.], v. 140, n. 6, p. 1184-1195, 26 fev. 2013. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.088849>.

SANTOS, Pedro da Rosa *et al.* GELEIA REAL E O SEU PAPEL NO SUPERORGANISMO *Apis mellifera*. **Sci. Agrar. Parana**, Marechal Cândido Rondon, v. 17, n. 1, p. 14-19, jan./mar. 2018.

SATYAVATHI, Valluri; GHOSH, Rupam; SUBRAMANIAN, Srividya. Long Non-Coding RNAs Regulating Immunity in Insects. **Non-Coding Rna**, [S.I.], v. 3, n. 1, 16 mar. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ncrna3010014>.

SAWATA, M. *et al.* Identification and analysis of the minimal promoter activity of a novel noncoding nuclear RNA gene, AncR-1, from the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Rna**, [S.I.], v. 10, n. 7, p. 1047-1058, 1 jul. 2004. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.5231504>.

SAWATA, Miyuki *et al.* Identification and punctate nuclear localization of a novel noncoding RNA, Ks-1, from the honeybee brain. **Rna**, [S.I.], v. 8, n. 6, p. 772-785, jun. 2002. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1017/s1355838202028790>.

SCHMEHL, Daniel R. *et al.* Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal Of Insect Physiology**, [S.I.], v. 71, p. 177-190, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.10.002>.

SCHMITT, Adam M.; CHANG, Howard Y.. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. **Cancer Cell**, [S.I.], v. 29, n. 4, p. 452-463, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.010>.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 27 mar. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.

SCHURCH, Nicholas J. *et al.* How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? **Rna**, [S.I.], v. 22, n. 6, p. 839-851, 28 mar. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.053959.115>.

SGOLASTRA, Fabio *et al.* Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Solitary Bees. **Environmental Entomology**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 22-35, 3 dez. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ee/nvy105>.

SHAKYA, Migun *et al.* Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. **Frontiers In Genetics**, [S.I.], v. 10, p. 0-0, 25 set. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.00904>.

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, [S.I.], v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 1 nov. 2003. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1239303>.

SIMPSON, Stephen J.; CASAS, Jérôme (ed.). Advances in Insect Physiology. In: OXLEY, Peter R.; OLDROYD, Benjamin P.. **The Genetic Architecture of Honeybee Breeding**. 39. ed. Burlington: Academic Press, 2010.

SLUIJS, Jeroen P. van Der; VAAGE, Nora S.. Pollinators and Global Food Security: the need for holistic global stewardship. **Food Ethics**, [S.I.], v. 1, n. 1, p. 75-91, 9 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s41055-016-0003-z>.

SOMAROWTHU, Srinivas *et al.* HOTAIR Forms an Intricate and Modular Secondary Structure. **Molecular Cell**, [S.I.], v. 58, p. 353-361, 16 abr. 2015.

SOUZA, Bruno de Almeida *et al.* **Geléia Real**: composição e produção. Piracicaba: Esalq, 2007. 25 p. (Série Produtor Rural, 37).

SOUZA, Darcet Costa (org.). **Apicultura**: manual do agente de desenvolvimento rural. Brasília: Sebrae, 2007. 186 p.

SRINIVASA, K. G.; SIDDESH, G. M.; MANISEKHAR, S. R. (ed.). **Statistical Modelling and Machine Learning Principles for Bioinformatics Techniques, Tools, and Applications**. Singapura: Springer, 2020. 332 p.

STARK, Rory; GRZELAK, Marta; HADFIELD, James. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, [S.I.], v. 20, n. 11, p. 631-656, 24 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>.

SU, Zhen-Dong *et al.* ILoc-lncRNA: predict the subcellular location of lncRNAs by incorporating octamer composition into general pseknc. **Bioinformatics**, [S.I.], v. 34, n. 24, p. 4196-4204, 21 jun. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bty508>.

SUBRAMANIAN, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.I.], v. 102, n. 43, p. 15545-15550, 30 set. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506580102>.

TADANO, H. *et al.* Age- and division-of-labour-dependent differential expression of a novel non-coding RNA, Nb-1, in the brain of worker honeybees, *Apis mellifera* L. **Insect Molecular**

Biology, [S.I.], v. 18, n. 6, p. 715-726, dez. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00911.x>.

TAKENAKA, Tetsuo; TAKENAKA, Yoko. Royal Jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.I.], v. 60, n. 3, p. 518-520, jan. 1996. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60.518>.

TANG, Haibao *et al.* **GOATOOLS**: tools for gene ontology. Tools for Gene Ontology. 2015. Disponível em: <https://zenodo.org/record/31628#.YGuHG-hKjIU>. Acesso em: 3 abr. 2021.

TEIXEIRA, Renata Roland. **Identificação das glicoproteínas da geléia real de *Apis mellifera* L. por análise em MALDI-TOF MS**. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

TESOVNIK, Tanja *et al.* Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and Varroa mites (*Varroa destructor*). **Plos One**, [S.I.], v. 12, n. 10, 31 out. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0187079>.

THE ENCODE CONSORTIUM. **Standards, Guidelines and Best Practices for RNA-Seq**. jun. 2011. V1.0. Disponível em: https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/dataStandards/ENCODE_RNAseq_Standards_V1.0.pdf. Acesso em: 02 fev. 2021.

TIAN, Yiting *et al.* Bioinformatics Analysis of Key Genes and circRNA-miRNA-mRNA Regulatory Network in Gastric Cancer. **Biomed Research International**, [S.I.], v. 2020, p. 1-16, 24 ago. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/2862701>.

TOTH, Amy L.; ROBINSON, Gene E.. Worker nutrition and division of labour in honeybees. **Animal Behaviour**, [S.I.], v. 69, n. 2, p. 427-435, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.03.017>.

TRIPATHI, Vidisha *et al.* The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. **Molecular Cell**, [S.I.], v. 39, n. 6, p. 925-938, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>.

TSUIJI, Hitomi *et al.* Competition between a noncoding exon and introns: gomafu contains tandem uacuaac repeats and associates with splicing factor-1. **Genes To Cells**, [S.I.], v. 16, n. 5, p. 479-490, 4 abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01502.x>.

ULITSKY, Igor; BARTEL, David p.. LincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms: Genomics, Evolution, and Mechanisms. **Cell**, [S.I.], v. 154, n. 1, p. 26-46, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>.

U.S. Department of Health and Human Services; U.S. Department of Energy. **UNDERSTANDING our genetic inheritance: the us human genome project, the first five years fy 1991--1995**. the us human genome project, the first five years fy 1991--1995. United States, 1990. 89 p. Disponível em:

https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/5yrplan/firstfiveyears.pdf. Acesso em: 27 dez. 2020.

VALANNE, Susanna *et al.* Immune-inducibile non-coding RNA molecule lincRNA-IBIN connects immunity and metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Plos Pathogens**, [S.I.], v. 15, n. 1, 11 jan. 2019. Public Library of Science (PLOS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007504>.

VAMATHEVAN, Jessica; APWEILER, Rolf; BIRNEY, Ewan. Biomolecular Data Resources: bioinformatics infrastructure for biomedical data science. **Annual Review Of Biomedical Data Science**, [S.I.], v. 2, n. 1, p. 199-222, 20 jul. 2019. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biodatasci-072018-021321>.

VAN VERK, Marcel C. *et al.* RNA-Seq: revelation of the messengers. **Trends In Plant Science**, [S.I.], v. 18, n. 4, p. 175-179, abr. 2013. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.001>.

VEDELEK, Viktor *et al.* Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome. **Bmc Genomics**, [S. I.], v. 19, n. 697, p. 1-19, 2018.

VERA, J. Cristobal *et al.* Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. **Molecular Ecology**, [S.I.], v. 17, n. 7, p. 1636-1647, abr. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2008.03666.x>.

VIDAU, Cyril *et al.* Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. **Plos One**, [S.I.], v. 6, n. 6, 28 jun. 2011. Public Library of Science (PLOS).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021550>.

VON FRISCH, K.; LINDAUER, M.. The. **Annual Review Of Entomology**, [S.I.], v. 1, n. 1, p. 45-58, jan. 1956. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.01.010156.000401>.

VON PLANTA, Adolf. Ueber den Futtersaft der Bienen. **Z. Physiol. Chem.**, [S.I.], v. 12, p. 327-354, 1 mar. 1888.

WALLBERG, Andreas *et al.* A hybrid de novo genome assembly of the honeybee, *Apis mellifera*, with chromosome-length scaffolds. **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 20, n. 1, 8 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-5642-0>.

WANG, Kevin C. *et al.* A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. **Nature**, [S.I.], v. 472, n. 7341, p. 120-124, 20 mar. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09819>.

WANG, Weiwen *et al.* Contrasting Sex-and Caste-Dependent piRNA Profiles in the Transposon Depleted Haplodiploid Honeybee *Apis mellifera*. **Genome Biology And Evolution**, [S.I.], v. 9, n. 5, p. 1341-1356, 1 maio 2017. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evx087>.

WANG, Xiaofei *et al.* Honey bee as a model organism to study gut microbiota and diseases. **Drug Discovery Today: Disease Models**, [S.I.], v. 28, p. 35-42, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2019.08.010>.

WANG, Yue *et al.* Genome-wide identification and characterization of putative lncRNAs in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Genomics**, [S.I.], v. 110, n. 1, p. 35-42, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.08.003>.

WANG, Zhong *et al.* RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, [S.I.], v. 10, n. 1, p. 57-63, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, [S.I.], v. 10, n. 1, p. 57-63, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

WEN, Kejia *et al.* Critical roles of long noncoding RNAs in *Drosophila* spermatogenesis. **Genome Research**, [S.I.], v. 26, n. 9, p. 1233-1244, 11 ago. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.199547.115>.

WICKRAMASINGHE, Saumya *et al.* Transcriptional profiling of bovine milk using RNA sequencing. **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 13, n. 45, 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-45>.

WIELEWSKI, Priscila *et al.* Relationship Between Hygienic Behavior and *Varroa destructor* Mites in Colonies Producing Honey or Royal Jelly. **Sociobiology**, [S.I.], v. 59, n. 1, p. 251-274, 2012.

WILLIAMS, Geoffrey R. *et al.* Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 5, n. 1, 13 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14621>.

WILLIAMSON, S. M.; WRIGHT, G. A.. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **Journal Of Experimental Biology**, [S.I.], v. 216, n. 10, p. 1799-1807, 7 fev. 2013. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.083931>.

WILLIAMSON, Sally M. *et al.* Exposure to Acetylcholinesterase Inhibitors Alters the Physiology and Motor Function of Honeybees. **Frontiers In Physiology**, [S.I.], v. 4, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00013>.

WOLSTENCROFT, Katherine *et al.* The Taverna workflow suite: designing and executing workflows of web services on the desktop, web or in the cloud. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 41, n. 1, p. 557-561, 2 maio 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt328>.

WU, Ming-Cheng *et al.* Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.I.], v. 88, p. 12-20, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>.

WU, Yuqi *et al.* Comparative transcriptome analysis on the synthesis pathway of honey bee (*Apis mellifera*) mandibular gland secretions. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, 3 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-04879-z>.

WU, Yuqian *et al.* Systematic Identification and Characterization of Long Non-Coding RNAs in the Silkworm, *Bombyx mori*. **Plos One**, [S.I.], v. 11, n. 1, 15 jan. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147147>.

WWPDB CONSORTIUM. **Protein Data Bank**: the single global archive for 3d macromolecular structure data. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 47, n. 1, p. 520-528, 24 out. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky949>.

XIONG, Jin. **Essential Bioinformatics**. [S. I.]: Cambridge University Press, 2006. 339 p.

YANG, Haojie *et al.* Integrated bioinformatics analysis of key genes involved in progress of colon cancer. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, [S.I.], v. 7, n. 4, 11 fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mgg3.588>.

YANG, Jian-Rong; ZHANG, Jianzhi. Human Long Noncoding RNAs Are Substantially Less Folded than Messenger RNAs. **Mol. Biol. Evol.**, [s. I.], v. 32, n. 4, p. 970-977, dez. 2014.

ZALUSKI, Rodrigo; JUSTULIN, Luis Antonio; ORSI, Ricardo de Oliveira. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, [S.I.], v. 7, n. 1, 9 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15581-5>.

ZANINI, Simon Anders And Fabio. **HTSeq Documentation**: release 0.13.5. Release 0.13.5. 2020. Disponível em: <https://buildmedia.readthedocs.org/media/pdf/htseq/master/htseq.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2021.

ZHANG, Wei *et al.* Identification of Maize Long Non-Coding RNAs Responsive to Drought Stress. **Plos One**, [S.I.], v. 9, n. 6, 3 jun. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098958>.

ZHANG, Xiaopei *et al.* Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 20, n. 22, 8 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20225573>.

ZHAO, Wenlong *et al.* A new bioinformatic insight into the associated proteins in psychiatric disorders. **Springerplus**, [S.I.], v. 5, n. 1, 14 nov. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-016-3655-6>.

ZHOU, Chenghao *et al.* Comparative Transcriptomic and Proteomic Analyses Identify Key Genes Associated With Milk Fat Traits in Chinese Holstein Cows. **Frontiers In Genetics**, [S.I.], v. 10, 13 ago. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2019.00672>.

ZHU, Bin *et al.* Genome-wide identification of lncRNAs associated with chlorantraniliprole resistance in diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). **Bmc Genomics**, [S.I.], v. 18, n. 1, 15

maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-3748-9>.

ZOU, Dong *et al.* Biological Databases for Human Research. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 55-63, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.006>.