

Universidade Estadual de Santa Cruz
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Iniciação Científica da UESC– PROIC – Edital 039/2022



Projeto de Pesquisado(a) Docente

(Máximo de 10 páginas – Projetos com mais de 10 páginas, incluindo as referências, serão desclassificados) - Recomendável: Fonte Arial ou Times New Roman, tamanho 12

INFORMAÇÕES GERAIS DO PROJETO

Título do Projeto: Investigação de genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante infecção viral para detecção de possíveis marcadores moleculares.

Envolverá pesquisa com Humanos, Animais ou OGMs (*Organismos Geneticamente Modificados*)?

() sim (x) não

Nº do protocolo ou do processo no respectivo Comitê*:

*O orientador deverá enviar a PROPP até 5 (cinco) meses após a implementação da bolsa a comprovação de aprovação do Comitê de Ética, sob pena de perda da bolsa, caso contemplado.

RESUMO

Em decorrência da variabilidade climática e ações antrópicas, muitas espécies e especificamente polinizadores como *Apis mellifera* são um dos principais insetos de importância mundial devido às suas atividades polinizadoras, tanto em culturas silvestres quanto cultivadas, conhecidas precursoras do crescimento produtivo global. As mudanças climáticas fizeram com que novos patógenos fossem responsáveis pela alta mortalidade dessa espécie, dentre eles os vírus. Vários estudos foram realizados para caracterizar a resposta hospedeiro-patógeno, utilizando distintos métodos, baseados tanto em PCR quanto no sequenciamento de RNA (RNA-Seq), empregados na investigação da expressão gênica, variantes de splice, TSSs e uso de promotor diferencial em *Apis mellifera* infectadas por patógenos. Esse cenário de declínio dessas espécies tem causado preocupação mundial, que tem buscado investigar estratégias de manejo e combate a essas infecções virais. Dessa forma, nesse projeto propõe-se investigar genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante a infecção por diferentes vírus para identificação de marcadores moleculares. Para isso, implementar-se-á uma revisão literária de diferentes artigos científicos que datam de um período de mais de 30 anos para minerar genes envolvidos na

interação abelha-vírus, que associados a posteriores análises bioinformáticas ajudarão no desenvolvimento de metodologias moleculares que auxiliem na detecção e monitoramento desses patógenos, contribuindo para a redução das mortes de abelhas, bem como a identificação de infecções precoces nas colmeias.

Palavras Chave (máximo 4): *Apis mellifera*, vírus, interação vírus-hospedeiro, marcadores moleculares.

DADOS COMPLEMENTARES DO PROJETO

Justificativa: *Situar o assunto e justificar a relevância do problema abordado, evidenciando como os resultados previstos pelo projeto justificam sua execução.*

As revisões literárias promovem a capacidade de obter dados de muitos estudos sobre um tema de interesse e, assim, pode torná-los conhecidos a todas aquelas pessoas ou pesquisadores que seus objetivos são desenvolvidos para o mesmo propósito de pesquisa. Vários cientistas que estudaram a diversidade de patógenos virais de abelhas, bem como de genes que são expressos diferencialmente no hospedeiro, contribuíram para a construção do conhecimento que se tem na atualidade.

(BRITTON, JANE WHITE, KA, 2021) no estudo sobre o efeito de infecções encobertas e evidentes na dinâmica de doenças em colônias de abelhas, demonstraram o impacto de diferentes classes de infecção tanto para abelhas quanto para seu vetor de infecção na manutenção de infecções virais dentro uma colônia de abelhas. Também destaca a importância da transição espontânea entre as classes de infecção em ambas as populações.

Ser capaz de investigar um tema de interesse global que incide sobre os diferentes genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante uma infecção viral contribuirá para obter informações específicas sobre genes envolvidos no combate e tolerância, geral ou específica, contra qualquer infecção oriunda de vírus, obtenção de dados genéticos que ajudarão a ser verificado através de análises bioinformáticas bem como análises moleculares para obtenção de genes marcadores que fornecerão as bases necessárias para a detecção precoce de diferentes infecções virais que atacam esta espécie. Desta forma, ajudando a monitorar e, possivelmente, reduzir as taxas de mortalidade das abelhas, mantendo um ambiente equilibrado e, portanto, aumentando a segurança alimentar da população.

OBJETIVO GERAL: *Sintetizar a finalidade geral do projeto.*

Desenvolver um levantamento literário sobre genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante uma infecção viral para detecção de marcadores moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: *Desdobrar o objetivo geral em finalidades de caráter mais específico.*

Descrever os patógenos virais, suas doenças e genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* descritos na literatura.

Identificar a especificidade de genes diferencialmente expressos envolvidos na interação *Apis mellifera*-patógeno viral de acordo com a espécie de vírus causador da infecção (geral ou específica).

Demonstrar através de análise de bioinformática a presença de genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante a infecção de diferentes vírus encontrados na revisão de artigos científicos usando diferentes estratégias (PCR vs RNA-Seq).

Estabelecer uma estratégia de biologia molecular para o uso dos marcadores de infecção em *Apis mellifera* para detecção de infecções precoces em colmeias.

REVISÃO DE LITERATURA (OU MODELO TEÓRICO)

A sobrevivência de todos os seres vivos ao longo da história dependeu estritamente da subsistência da diversidade ecológica do planeta, existindo o chamado ciclo de vida, bem como da sinergia desses indivíduos nos diferentes ecossistemas da terra. Devido ao aquecimento global e às mudanças climáticas, a diversidade de espécies é atacada devido à variabilidade climática que enfrenta todos os dias, reduzindo as populações de espécies e ameaçando-as ao ponto de extinção.

A abelha *Apis mellifera* é uma das espécies de inseto que colonizou com sucesso inúmeros ecossistemas em todo o mundo, sendo considerada uma das mais importantes devido às funções que desempenha no meio ambiente, desempenhando um papel crucial na polinização de plantas silvestres, bem como o aumento da produtividade das plantas cultivadas, as abelhas apresentam implicações substanciais para a economia global, preservação dos ecossistemas naturais e bem-estar humano (VILLALBA, A.; MAGGI, M.; ONDARZA, PM ; et al., 2020; NOWAK; SZCZUKA, GÓRCZYŃSKA et al., 2021).

As abelhas fornecem um elo fundamental na produção global de alimentos e na segurança alimentar, com um valor econômico estimado em mais de US\$ 15 bilhões somente para os Estados Unidos (VILSACK, MCCARTHY, 2016; ZHENG, POWELL, J. STEELE; et al. 2017; NOWAK; SZCZUKA, GÓRCZYŃSKA et al., 2021), devido ao seu grande potencial para produtos de alto valor comercial como própolis, geleia real, cera, pólen e mel (GALLAI, SALLES, SETTELE, et al., 2009; BROWN , PAXTON., 2009; VILLALBA, A.; MAGGI, M.; ONDARZA, PM; et al., 2020; NOWAK; SZCZUKA, GÓRCZYŃSKA et al., 2021).

Atualmente existe uma grande preocupação (SEITZ, TRAYNOR, STEINHAEUER, et al. 2015) por parte de cientistas, ambientalistas e principalmente produtores, pois houve uma diminuição de polinizadores, especificamente as populações de *Apis mellifera* que sofreram alta mortalidade de colônias durante a última

década em todo o mundo (SEITZ, TRAYNOR, STEINHAUER, et al. 2015, ZHENG, POWELL, STEELE; et al., 2017), por motivos diversos, que variam entre ações humanas e eventos naturais (EVANS; SPIVAK, 2010).

Ao apresentar uma resposta imune, ela pode ser quantificada empiricamente usando medidas de imunocompetência (IC) onde se observa a capacidade de um organismo ser capaz de dar uma resposta imune, as abelhas, sendo insetos eussociais, desenvolveram várias adaptações ao nível fisiológico, organizacional, celular, humoral (não celular) bem como ações comportamentais, onde se observa o antisséptico higiênico em *Apis mellifera* que contribui para poder reduzir a transmissão e suscetibilidade a diferentes infecções, reduzindo as cargas de patógenos na colônia (RIBEIRO, BREHÉLIN., 2006; WILSON- RICH, SPIVAK, FEFERMAN.; et al 2009; MOOKHPLOY, KRONGDANG, CHANTAWANNAKUL., 2021). Esse comportamento impede que a infecção possa ser transferida por várias vias, incluindo horizontal, vertical (da rainha para o ovo), por vetores físicos ou biológicos e pelo meio ambiente, principalmente devido aos recursos alimentares que são armazenados (RITTON, JANE WHITE, K. A, 2021).

Os avanços na genômica permitiram a realização de diversos estudos sobre a evolução de diferentes sistemas biológicos, como o sistema imunológico. Portanto, todas essas investigações têm sido de grande valia, fornecendo conhecimento para melhor compreensão dos procedimentos e prevenção de diferentes doenças em espécies de importância social ou econômica. Assim, o sequenciamento do genoma de *A. mellifera* contribuiu para poder fazer um prognóstico dos componentes do sistema imunológico (EVANS, J D; ARONSTEIN, K; CHEN, Y P; et al., 2006).

Durante as últimas décadas, diversos estudos nas áreas de biologia molecular têm utilizado diversos métodos baseados em PCR como ferramentas eficientes para a detecção mais rápida, específica e sensível, de material genético, auxiliando assim a quantificar diferentes infecções transmitidas por vírus, patógenos na abelha (HUANG, LI, ZHANG, Yi; et al., 2021).

Com os avanços científicos e tecnológicos, o sequenciamento de nova geração tem sido amplamente utilizado por muitos pesquisadores, entre elas destaca-se o sequenciamento de RNAs (RNA-Seq) que é focado no sequenciamento de alto rendimento de moléculas de RNA para realizar análise de conjuntos de transcritos de uma amostra. Através da síntese e sequenciamento massivo do cDNA é possível definir éxons, limites do 5' e 3' UTR, e íntrons e até mesmo avaliar diversidade microbiana. Também é muito importante na classificação dos níveis de expressão gênica (NAGALAKSHMI, et al., 2008; BADAoui, et al., 2017). Além disso, o RNA-seq ainda permite uma caracterização ampla de todo o transcriptoma de uma amostra, incluindo sítios de início da transcrição (TSS), variantes de splicing e uso de promotor diferencial (tra, et al., 2008).

Nesse projeto, pretende-se realizar uma investigação dos genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante a infecção viral para a identificação de marcadores moleculares. Através de levantamento literário, espera-se identificar genes possivelmente envolvidos na infecção de vírus, classificando-os por seu tipo de resposta, geral ou específica em cada infecção viral. Desta forma, esse trabalho pode contribuir para a redução da mortalidade das populações de abelhas através dos genes marcadores identificados com sua especificidade de resistência geral ou específica para cada infecção viral, o que ajudará a reforçar muitas lacunas científicas encontradas nos diversos estudos científicos, contribuições de grande importância para fins moleculares e biotecnológicos que melhoram a sustentabilidade ambiental desse polinizador, bem como a segurança alimentar mundial.

METODOLOGIA: *Descrever detalhadamente a metodologia a ser utilizada no desenvolvimento do projeto*
Levantamento bibliográfico

Para realizar o levantamento bibliográfico sobre genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante a infecção por diferentes vírus, serão utilizados bancos de dados de artigos como Pub-Med, Google Scholar e Web of Science.

Seleção de palavras-chaves e período de publicação

Serão selecionadas diferentes palavras-chave que devem ser escritas em inglês como: genes em *Apis mellifera*, *Apis mellifera*, marcadores moleculares em *Apis mellifera*, infecção viral em *Apis mellifera*; em cada uma das bases de dados utilizadas. Será avaliado num intervalo de mais de 30 anos datados de 1990 ao ano de vigência do projeto, o que resultará em uma gama de artigos numa base de dados para cada palavra-chave fazendo um somatório da pesquisa para poder obter o número total de artigos com que a pesquisa começará.

Critério da seleção do artigo

Os critérios ajudarão a obter um maior número de artigos científicos e informações adequadas com dados confiáveis para a publicação final da pesquisa.

1. Artigos científicos que estejam apenas em inglês.
2. Itens encontrados em um período de 1990 ao ano de vigência do projeto.
3. Que sejam apenas artigos publicados e revisado por pares.
4. Que seus estudos sejam sobre doenças virais, infecções virais, marcadores moleculares, ferramentas de bioinformática e genes de *Apis Mellifera*.

Seleção e descarte de artigos científicos

Para realizar a seleção e descarte de artigos científicos, os critérios de seleção devem ser observados e desta forma poder rejeitar ou aceitar cada um deles, então proceder à leitura dos títulos e resumos de cada um dos que foram aceitos em seguida realizar um filtro de seleção e assim obter informações precisas para a publicação, fazendo um inventário total de todos aqueles que não foram utilizados na investigação pelos critérios exigidos bem como todos aqueles que se a informação apresentada foi utilizada.

Download e descarte de artigos duplicados

Todos os artigos que atenderem aos critérios de seleção serão baixados com a ferramenta Zotero e aqueles que forem artigos para download serão adicionados a um banco de dados que contribuirá para a redação e pesquisa científica proposta.

Deteção bioinformática de genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante a infecção viral para deteção de marcadores moleculares.

Com os genes classificados, será realizada um critério estatístico mínimo quanto à expressão do gene ($p\text{-value} < 0.05$) para que se obtenha maior precisão a partir das informações encontradas sobre genes diferencialmente expressos em *Apis mellifera* durante a infecção de diferentes patógenos virais.

Quando um processo biológico é anormal em um determinado estudo, os genes que trabalham juntos devem ter um potencial maior (enriquecido) para serem selecionados como um grupo relevante por tecnologias de triagem de alto rendimento (HUANG, SHERMAN; LEMPICKI., 2009).

Para tanto, utilizará a análise de uma lista de genes e que esta pode ir de uma visão orientada a genes individuais para uma análise baseada em grupos de genes relevantes. Como a conclusão analítica é baseada em um grupo de genes relevantes e não em um gene individual, aumenta a probabilidade de os pesquisadores combinarem os processos biológicos corretos mais apropriados aos fenômenos biológicos em estudo (HUANG, SHERMAN; LEMPICKI., 2009).

A Tabela 1 mostra as possíveis ferramentas de análise para poder determinar o enriquecimento dos genes pré-selecionados, para que sejam levados em consideração para as análises bioinformáticas. Esses dados podem ser explorados para corroborar genes previamente identificados por outras estratégias que não o Sequenciamento de nova geração, como PCR e Microarray.

Tabela 1 Categorização de ferramentas de análise de enriquecimento

Categoria de ferramenta	Descrição	Indicação e limitação	Subtipo de algoritmos	Métodos	Ferramenta de exemplo
Classe I: análise de enriquecimento singular (SEA)	O valor P de O enriquecimento é calculado em cada termo da lista de genes interessantes pré-selecionada. Em seguida, os termos enriquecidos são listados em um formato de texto linear simples. Esta estratégia é o algoritmo mais tradicional. Ele ainda é predominantemente usado pela maioria das ferramentas de análise de enriquecimento.	Capaz de analisar qualquer lista de genes, que pode ser selecionada a partir de quaisquer estudos/tecnologia s biológicas de alto rendimento (por exemplo, Microarray, ChIP-on-CHIP, ChIP-on-sequence, SNP array, EXON array, sequência em grande escala etc.). No entanto, as inter-relações mais profundas entre os termos podem não ser totalmente capturadas no relatório de formato linear.	Fundo de referência global Fundo de referência local Rede neural	Binomial qui-quadrado hipergeométrico exato de Fisher Binomial qui-quadrado hipergeométrico exato de Fisher Bayesiano	GoStat, GoMiner, GOTM, BinGO, GToolBox, GFinder etc. DAVID, Onto-Express, GARBAN, FatiGO etc. BayGO
Classe II: análise de enriquecimento do conjunto de genes (GSEA)	Genes inteiros (sem pré-seleção) e valores experimentais associados são considerados na análise de enriquecimento. As características únicas desta estratégia são: (i) Não há necessidade de pré-selecionar genes interessantes, ao contrário das Classes I e II; (ii) Valores experimentais integrados no cálculo do valor - P	Adequado para estudos biológicos em pares (por exemplo, doença versus controle). Atualmente, pode ser difícil de ser aplicado às diversas estruturas de dados derivadas de um projeto experimental complexo e algumas das novas tecnologias (por exemplo, SNP, EXON, matrizes de promotores).	Com base na lista de genes classificados com base em valores de genes contínuos	Kolmogorov–Smirnov-like t -Test permutação Z -score	GSEA, CapMap etc. FatiScan, ADGO, ermineJ, PAGE, iGA, GO-Mapper, GDist, FINA, T-profiler, MetaGP etc.
Classe III: análise de enriquecimento	Esta estratégia herda o espírito chave da AAE. No entanto, as	Capaz de analisar qualquer lista de genes, que pode	Anotações compostas Estrutura do DAG	Medir o enriquecimento em termos conjuntos	ADGO, GeneCodis, ProfCom etc.

modular (MEA)	relações termo-termo/gene-gene são consideradas no cálculo do valor P de enriquecimento. A vantagem dessa estratégia é que a relação termo-termo/gene-gene pode conter um significado biológico único que não é mantido por um único termo ou gene. Essa análise de rede/modular está mais próxima da natureza da estrutura de dados biológicos.	ser selecionada de qualquer estudo/tecnologia biológica de alto rendimento, como Classe I. Ênfase nas relações de rede durante a análise. Gene/termo 'órfão' (com poucas relações com outros genes/termos), que às vezes pode ser muito interessante também, pode ser deixado de fora da análise.	Relacionamento de anotação global	medir o enriquecimento considerando as relações pais- filhos medir a semelhança global termo- termo com a correlação de Kappa Statistics Czekanowski-Dice Pearson	topGO, Ontologizer, POSOC etc. DAVID, GoToolBox etc.
---------------	--	---	-----------------------------------	---	--

(HUANG, SHERMAN; LEMPICKI., 2009)

INFRAESTRUTURA DISPONÍVEL: *Especificar a infraestrutura para execução do projeto*

Campus Soane Nazaré de Andrade Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC): possui todos os equipamentos e laboratórios do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) necessários para realizar a pesquisa e o cronograma proposto e atender aos objetivos propostos na referida pesquisa. Para análise de dados e bioinformática, a UESC conta ainda com o Núcleo de Biologia Computacional e Gestão da Informação Biotecnológica (NBCGIB).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BADAOUI, Bouabid et al, RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*, PLoS ONE, v. 12, n. 3, p.e0173438, 2017

BRITTON, Nicholas F.; JANE WHITE, K. A. The Effect of Covert and Overt Infections on Disease Dynamics in Honey-Bee Colonies. *Bulletin of Mathematical Biology*, v. 83, n. 6, p. 67, 2021.

BROWN, Mark J. F.; PAXTON, Robert J. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, v. 40, n. 3, p. 410–416, 2009.

EVANS, J D; ARONSTEIN, K; CHEN, Y P; et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, v. 15, n. 5, p. 645–656, 2006.

EVANS, Jay D.; SPIVAK, Marla. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 103, p. S62–S72, 2010.

GALLAI, Nicola; SALLES, Jean-Michel; SETTELE, Josef; et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, v. 68, n. 3, p. 810–821, 2009.

HUANG, Da Wei; SHERMAN, Brad T.; LEMPICKI, Richard A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 1, p. 1–13, 2009.

HUANG, Shaokang; LI, Jianghong; ZHANG, Yi; et al. A novel method for the detection and diagnosis of virus infections in honey bees. *Journal of Virological Methods*, v. 293, p. 114163, 2021.

MOOKHPLOY, Wannapha; KRONGDANG, Sasiprapa; CHANTAWANNAKUL, Panuwan. Effects of Deformed Wing Virus Infection on Expressions of Immune- and Apoptosis-Related Genes in Western Honeybees (*Apis mellifera*). *Insects*, v. 12, n. 1, p. 82, 2021.

MORTAZAVI, Ali et al, Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA- Seq, *Nature Methods*, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008.

NAGALAKSHMI, Ugrappa et al, The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing, *Science (New York, N.Y.)*, v. 320, n. 5881, p. 1344–1349, 2008.

NOWAK, Adriana; SZCZUKA, Daria; GÓRCZYŃSKA, Anna; et al. Characterization of *Apis mellifera* Gastrointestinal Microbiota and Lactic Acid Bacteria for Honeybee Protection—A Review. *Cells*, v. 10, n. 3, p. 701, 2021.

RIBEIRO, Carlos; BREHÉLIN, Michel. Insect haemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, v. 52, n. 5, p. 417–429, 2006.

SEITZ, Nicola; TRAYNOR, Kirsten S.; STEINHAEUER, Nathalie; et al. A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research*, v. 54, n. 4, p. 292–304, 2015.

VILLALBA, A.; MAGGI, M.; ONDARZA, P. M.; et al. Influence of land use on chlorpyrifos and persistent organic pollutant levels in honey bees, bee bread and honey: Beehive exposure assessment. *Science of The Total Environment*, v. 713, p. 136554, 2020.

VILSACK, Hon Tom; MCCARTHY, Hon Gina. Pollinator Partnership Action Plan. p. 30, 2016

WILSON-RICH, Noah; SPIVAK, Marla; FEFFERMAN, Nina H.; et al. Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annual Review of Entomology*, v. 54, n. 1, p. 405–423, 2009.

ZHENG, Hao; POWELL, J. Elijah; STEELE, Margaret I.; et al. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 18, p. 4775–4780, 2017.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES DO PROJETO *(Insira quantas linhas forem necessárias)*

Metas	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão de literatura	X	X	X	X								
Consolidação dos dados				X	X	X						
Análises de Bioinformática						X	X	X	X			
Caracterização dos genes e Vias identificadas								X	X	X	X	
Redação de relatórios científicos										X	X	X