UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**MicroRNAs, coordenadores potenciais da via de insulina e do
processo de envelhecimento de *Apis mellifera***

FÁBIO OLIVEIRA BARBIN

Ribeirão Preto/SP

2019

FÁBIO OLIVEIRA BARBIN

**MicroRNAs, coordenadores potenciais da via de insulina e do
processo de envelhecimento de *Apis mellifera***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de
Pós-Graduação em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Ribeirão Preto/SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Barbin, Fábio Oliveira

MicroRNAs, coordenadores potenciais da via de insulina e do processo de envelhecimento de *Apis mellifera* – Ribeirão Preto, 2019. 72p.

Orientadora: Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Genética

1. miRNA. 2. Envelhecimento. 3. Via de Insulina. 4. Expressão Gênica.
5. *Apis mellifera*

Apoio Financeiro:

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do projeto inscrito sob processo número: 2016/06657-0. O aluno obteve apoio financeiro através de bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Fábio Oliveira Barbin

Título da Dissertação: MicroRNAs, coordenadores potenciais da via de insulina e do processo de envelhecimento de *Apis mellifera*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração: Genética.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2019.

*Aos meus pais, José Ari e Maria José,
Aos meus irmãos Daniel, Vinícius e Gustavo...
À Raini e Valentina
Aos demais familiares e amigos
.... Dedico.*

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, minha orientadora, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, pela paciência, pelos momentos de descontração e também pelas conversas acerca das pesquisas, pelo apoio não só durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos durante estes anos que estive neste grupo Obrigado por ser peça fundamental de minha formação.
- Agradeço também à Profa. Dra. Márcia Maria Gentile Bitondi pelas sugestões e opiniões, em especial na fase de obtenção das imagens.
- À Profa. Dra. Anete Lourenço pelas ajudas com as dúvidas, em geral, referentes às coletas e qPCR.
- Sou grato também à Profa. Dra. Flávia Freitas que no início deste trabalho me apoiou e me ajudou com diversas dúvidas que tive.
- Aos amigos que aqui fiz, Dr. Fabiano Abreu, Ma. Danielle Lucena, Franciene Rabiço, Patrick Souza, Leonardo Nascimento, Rodrigo Souza pelos momentos que passamos juntos no Laboratório compartilhando boas histórias, risadas e troca de conhecimentos e por me ajudarem a seguir em frente com a ajuda em algumas dúvidas e experimentos.
- À toda equipe do LBDA, em nome da Dra. Vera Figueiredo e do Luiz Aguiar por me ajudarem a resolver problemas relativos à experimentação e obtenção de amostras.
- A todos os funcionários do Departamento que garantem que tudo funcione da melhor forma possível e em especial à Susie Nalon por cuidar de toda a parte burocrática e sempre me atender com paciência e sanar os problemas encontrados.

- Deixo meu agradecimento especial aos amigos mais próximos, Me. Thiago Depintor (que sempre esteve junto em tantos bons momentos, altas histórias e aventuras), Ma. Luana Bataglia (que me ajudou bastante, me ouviu e apoiou em diversos momentos) e Me. Lucas Agostini (que tava sempre por ai contando me fazendo rir até das piores coisas e dando força pra seguir). Sem eles essa caminhada teria sido muito mais difícil.
- Meu agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por fomentar toda a pesquisa.
- À Universidade de São Paulo por proporcionar meu crescimento profissional e pessoal.
- Aos meus pais que sempre me proporcionaram o melhor, que acreditaram em mim, pelo amor e carinho. Sem vocês nada disso seria possível.
- Aos meus irmãos pelo carinho, confiança, apoio e suporte.
- À Raini Araújo e Valentina que, embora estão há pouco tempo na minha vida, puderam proporcionar bons momentos, risadas e paz nessa reta final tão difícil.
- Aos amigos que a vida me deu pelos tempo e momentos que passamos juntos e que levarei na memória como grandes lembranças.
- Aos professores e técnicos que se tornaram grandes mentores e amigos.
- A todos que de alguma forma ajudaram e apoiaram na realização deste trabalho.

RESUMO

O envelhecimento é um declínio progressivo e natural de todas as funções fisiológicas intrínsecas a todos os organismos resultante das interações genéticas e ambientais. Uma importante via do metabolismo é particularmente afetada pela senescência, a via de sinalização da insulina, uma via altamente conservada de organismos menos derivados até vertebrados. Em *Apis mellifera* durante a fase adulta ocorre um processo relacionado ao envelhecimento: as funções assumidas pelas abelhas jovens são diferentes daquelas das abelhas mais velhas, evento esse conhecido como polietismo etário. Na fase jovem, as operárias denominadas nutrízes organizam a colônia e alimentam as larvas, mas a partir da segunda semana as operárias passam a realizar atividades fora do ninho, em busca de pólen e néctar, sendo então chamados de forrageiras. Uma característica singular, a plasticidade fenotípica, permite mudanças neste programa. Dessa forma, diversos fatores influenciam nessa característica e como exemplo a distribuição demográfica da colônia que com menor número de abelhas jovens, as forrageiras assumem o *status* de nutrízes, retornando às tarefas anteriores, como a síntese da geléia real e a alimentação das larvas. O polietismo etário tem reflexos não apenas sobre a fisiologia dessas abelhas, mas também sobre o comportamento e vias metabólicas específicas, como a via de sinalização da insulina e seus reguladores moleculares. Os microRNAs são uma dessas moléculas reguladoras. Eles participam de muitas vias de sinalização sistêmica, incluindo a insulina. No entanto, ainda existem questões não respondidas: como os microRNAs, interagindo com a insulina e as vias de ecdisteróides, interferem na maturação e no envelhecimento das abelhas? A via da insulina desempenha um papel importante no processo de envelhecimento e a abelha *A. mellifera* é um bom modelo para este estudo. Neste trabalho obtivemos, através de qRT-PCR, a transcrição relativa de genes ao longo da vida adulta das abelhas tanto em condições normais quanto em condição de orfandade e assim definimos a participação de microRNAs específicos, miR -8, miR-14 e miR-34, na regulação dos genes de *pten*, *DOR*, *pi3k*, *chico* e *eip74ef* que são modulados no processo de envelhecimento em muitos organismos. Além disto, analisamos a morfologia das células do corpo gorduroso, em sua resposta ao envelhecimento e condição de orfandade. Ao final pudemos concluir que moléculas reguladoras, vias metabólicas e inclusões citoplasmáticas, resultantes da modificação do metabolismo, podem ser indicadores do processo de desenvolvimento adulto nestas abelhas e provavelmente em outros organismos.

PALAVRAS CHAVE: miRNA, envelhecimento, via de insulina, expressão gênica, *Apis mellifera*.

MicroRNAs, potential coordinators of the insulin pathway and the aging process of *Apis mellifera*

ABSTRACT

Aging is a progressive and natural decline of all the physiological functions intrinsic to all organisms resulting from genetic and environmental interactions. An important pathway of metabolism is particularly affected by senescence, the insulin-signaling pathway, a highly conserved pathway from less derived to vertebrate organisms. In *Apis mellifera*, during the adult phase, an aging process occurs: the functions assumed by the young bees are different from those assumed by the older bees, an event known as age polyethism. In the young phase, workers called nurses organize the colony and feed the larvae, but from the second week on, the workers begin to perform activities out of the nest, in search of pollen and nectar, and are now called foragers. A unique characteristic, the phenotypic plasticity, allows changes in this program. Thus, several factors influence this characteristic and, as an example, the demographic distribution of the colony, which, with a lower number of young bees, the foragers assume the status of nurses, returning to previous tasks, such as the synthesis of royal jelly and feeding of larvae. Age polyethism has reflexes not only on the physiology of these bees, but also on their behavior and specific metabolic pathways, such as the insulin signaling pathway and its molecular regulators. MicroRNAs are one of these regulatory molecules. They participate in many systemic signaling pathways, including insulin. However, there are still unanswered questions: how do microRNAs, interacting with insulin and ecdysteroid pathways, interfere with the maturation and aging of bees? The insulin pathway plays an important role in the aging process and *A. mellifera* bee is a good model for this study. In this work, we obtained, through qRT-PCR, the relative transcription of genes throughout the adult life of the bees in both normal conditions and orphaned conditions, thus suggesting the participation of specific microRNAs, miR-8, miR-14 and miR-34, in the regulation of the *pten*, *DOR*, *pi3k*, *chico* and *eip74ef* genes that are modulated in the aging process in many organisms. In addition, we analyzed the morphology of fat body cells in their response to aging and orphanage condition. In the end, we could conclude that regulatory molecules, metabolic pathways and cytoplasmic inclusions, resulting from the metabolic modification, can be indicators of the adult development process in these bees and probably in other organisms.

KEYWORDS: miRNA, aging, insulin pathway, gene expression, *Apis mellifera*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interações dos miRNA com genes da via de insulina.....	21
Figura 2. Perfis dos hormônios ecdisteroides e hormônio juvenil (JH) durante o desenvolvimento pós-embrionário de castas de <i>Apis mellifera</i>	25
Figura 3. Modelo geral da diferenciação de castas em <i>Apis mellifera</i>	26
Figura 4. Níveis de Hormônio Juvenil e Vitelogenina em abelhas adultas.	29
Figura 5. Rede de interação miRNA-mRNA alvo.	41
Figura 6. Experimentos de PCR convencional e análise em gel de agarose para otimização dos primers descritos na Tabela 1.	42
Figura 7. Análise dos produtos de PCR para verificação da eficiência dos primers desenhados para amplificação de chico, pi3k e pten.	43
Figura 8. Análise da morfologia das células do corpo gorduroso de do corpo gorduroso de <i>Apis mellifera</i> , coradas por DAPI (azul) e Faloidina (vermelho)..	47
Figura 9. Gráfico referente às mensurações realizadas no software Image J utilizando os dados de área total dos grânulos dos enócitos de <i>A. mellifera</i> mostrados na tabela 2.....	48
Figura 10. Processamento de imagens pelo programa Image J, para mensuração da área ocupada pelos grânulos do citoplasma dos enócitos do corpo gorduroso de operárias de <i>A. mellifera</i>	49
Figura 11. Perfil de transcrição dos miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	52
Figura 12. Perfil de transcrição dos genes pten e pi3k em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	53
Figura 13. Perfil de transcrição dos genes DOR e chico em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	54
Figura 14. Perfil de transcrição do gene e74 em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de <i>Apis mellifera</i>	55

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 O papel da via de Insulina no processo de envelhecimento	12
1.2 Papel dos microRNAs na regulação da via de insulina	18
1.3. As abelhas como modelo para estudos de envelhecimento	22
1.4. Justificativa	31
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivos Gerais	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. Material e Métodos.....	35
3.1 Caracterização da via de insulina e dos miRNAs reguladores em <i>Apis mellifera</i>	35
3.1.1 Anotação os genes e desenho dos <i>primers</i>	35
3.1.2 Predição dos miRNAs reguladores dos genes da via de insulina	36
3.2 Perfil de expressão dos genes da via de insulina e dos miRNAs candidatos a reguladores	37
3.2.1 Coleta do Material Biológico	37
3.2.2 Dissecção do material.....	37
3.2.3 Extração do RNA total.....	38
3.2.4 Síntese de cDNA.....	38
3.2.5 PCR convencional e eletroforese para avaliação da eficiência dos <i>primers</i>	39
3.2.6 Perfil de expressão dos genes da via de insulina e dos miRNAs candidatos a reguladores	39
3.3 Avaliação da morfologia do corpo gorduroso em condição normal e condição de orfandade	40
4. Resultados e discussão	41
4.1 Reconstrução de redes de interação gênica.....	41
4.3 Análise da morfologia das células do corpo gorduroso.....	43
4.4 Análise da expressão dos genes candidatos e miRNAs em abelhas.....	49
5. Conclusão	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO I	72

1. Introdução

Longevidade e envelhecimento, dois termos que podem ser confundidos entre si: a duração do tempo entre o nascimento até a morte é definido como longevidade (SCHULZ, 1996), o envelhecimento, no entanto, é um processo que ocorre em todos os organismos e está sujeito a diversos fatores que provocam, de alguma maneira, alterações da homeostasia de processos fisiológicos tanto a nível celular quanto tecidual ou até mesmo do organismo como um todo (HERNDON et al., 2002; ROZHOK; SALSTROM; DEGREGORI, 2014; STROUSTRUP et al., 2016) levando a um processo de deterioração das funções metabólicas de um organismo (FLATT; SCHMIDT, 2009).

A nutrição mantém uma estreita relação com o tempo de vida, fazendo da dieta um fator determinante para o desenvolvimento e sobrevivência de um organismo, produzindo efeitos significativos às características relacionadas com envelhecimento (CHRYSOHOOU; STEFANADIS, 2013; PEREGRIN, 2001; ROBERTS; MUTCH; GERMAN, 2001).

A abelha *Apis mellifera* é um excelente modelo para o estudo do desenvolvimento adulto e envelhecimento, por pelo menos duas características: um claro polietismo etário e uma importante via metabólica admiravelmente conservada, a via de insulina. Essa via está diretamente ligada à alimentação e o polietismo etário cumprido pelas abelhas tem como uma de suas principais características a mudança da dieta. Logo, o estudo de genes da via de insulina ao longo do envelhecimento das abelhas pode trazer informações acerca desse evento.

1.1 O papel da via de Insulina no processo de envelhecimento

O envelhecimento pode se iniciar precocemente ou tardiamente, ao longo da vida, influenciando na longevidade (DANNEFER; DAUB, 2009). Sugere-se que a extensão

do tempo de vida seja mediada por diversos mecanismos genéticos, que ainda são pouco compreendidos (PIPER et al., 2008; RUSSELL; KAHN, 2007).

As alterações do metabolismo, decorrentes do envelhecimento provocam uma série de mudanças no organismo, tais como: mudanças na composição corporal (ST-ONGE; GALLAGHER, 2010), na resistência à insulina (MORLEY, 2008) e declínios fisiológicos em múltiplas vias de sinalização (BARZILAI et al., 2012; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). As vias de sinalização da insulina, do hormônio do crescimento (HG, do inglês *hormone growth*) e dos hormônios esteroides sexuais, estão entre as principais vias de sinalização envolvidas na regulação do tempo de vida dos organismos (BARZILAI et al., 2012).

A via de sinalização do fator de crescimento, Insulina/semelhante à insulina 1, (doravante, IIS, do inglês *Insulin/insulin-like growth fator-1 signalling*), que é sensível ao *status* nutricional (LU et al., 2016), é altamente conservada e é encontrada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BARBIERI et al., 2003; BARZILAI et al., 2012), no nemátodo *Caenorhabditis elegans* (BARBIERI et al., 2003; BARZILAI et al., 2012; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; MCELWEE et al., 2007), na mosca das frutas *Drosophila melanogaster* (BARBIERI et al., 2003; BARZILAI et al., 2012; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; MCELWEE et al., 2007), nas abelhas *Apis mellifera* (DE AZEVEDO; HARTFELDER, 2008), nos roedores (BARBIERI et al., 2003; LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; MCELWEE et al., 2007) e em humanos (BARBIERI et al., 2003; HEEMST, 2010), ou seja, desde os organismos menos derivados até os vertebrados mais complexos.

Quando se compara a via de sinalização da insulina/fatores de crescimento semelhantes à insulina em abelhas com a via em moscas das frutas ou no nemátodo *C. elegans*, pode-se observar diferenças nos seus componentes, pois em abelhas há

apenas dois ligantes nesta via, que são pequenos peptídeos semelhantes à insulina (AmILP-1 e AmILP-2) e dois receptores de insulina (AmInR-1 e AmInR-2) enquanto que *C. elegans* possui 37 genes codificadores de ligantes e *Drosophila* possui 7. Em relação aos receptores, tanto *Drosophila* quanto *C. elegans* possuem apenas 1 ortólogo (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006; WHEELER; BUCK; EVANS, 2006). Observa-se também que as abelhas possuem quatro ortólogos do gene regulador da longevidade, *daf-16* de *C. elegans*, já em *D. melanogaster* há apenas um, dFOXO (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006). Nas abelhas, encontra-se também *chico*, que é um gene codificante para o substrato do receptor de insulina e tanto mutações neste substrato quanto a inibição do gene que o transcreve em moscas, ativam o ortólogo de FOXO (dFOXO) estendendo o tempo de vida deste organismo. (CLANCY, 2001).

GARG E COHEN mostraram em seu trabalho de 2014 estudos em *C. elegans* que identificaram mutações em genes que levaram ao prolongamento do tempo de vida destes organismos. Os genes em questão foram *daf-2*, *age-1* e *daf-16* que mostraram agir em uma via comum e estudos posteriores ligaram estes genes à via de sinalização de insulina/IGF (IIS). Um componente desta via, *pi3kinase* (*pi3k*), foi identificado como mutante de *age-1*, *daf-2* como um receptor semelhante à insulina e *daf-16* como um fator de transcrição da família FOXO cuja atividade mostrou ser regulada pela via IIS/PI3K/AKT.

Os fatores de transcrição FOXO são reguladores do envelhecimento evolutivamente conservados e inibidos pela via de sinalização dos fatores de crescimento insulina/semelhante à insulina (IIS) (KENYON, 2010). WEBB, KUNDAJE E BRUNET (2016) revisaram trabalhos que mostram que a deficiência no receptor de insulina (*daf-2*) de *C. elegans*, dobra o tempo de vida desse organismo pela ativação

de FOXO/DAF-16. Em moscas, quando há a ocorrência de mutações no gene do receptor semelhante à insulina (*InR*) ou então na proteína substrato do receptor de insulina (CHICO), ocorre a ativação do ortólogo de FOXO (dFOXO) levando ao prolongamento do tempo de vida em 85% (mutações em *InR*) e em 48% (mutações em CHICO). A longevidade em ratos também é aumentada quando fatores que ativam FOXO, como IGF1 ou a sinalização da insulina é reduzida. Dessa forma, FOXO desempenha um papel central na mediação dos efeitos da via IIS sobre o envelhecimento. (GARG; COHEN, 2014; WEBB; KUNDAJE; BRUNET, 2016). Proteínas FOXO (Forkhead box O) desempenham um dos papéis mais importante na via de sinalização IIS/PI3K/Akt (BRUNET et al., 1999; DONG et al., 2008) pois promovem a adaptação das células, gerando estabilidade metabólica destas em condições de estresse e escassez de alimentos (VAN DER HORST; BURGERING, 2007). Enquanto os peptídeos semelhantes à insulina são pequenos ligantes, outros componentes da via como CHICO e PTEN são grandes proteínas que respondem a estes ligantes (WHEELER; BUCK; EVANS, 2006).

Pten é um gene traduzido em grandes fosfatases que fazem parte da cascata de sinalização da via da insulina e respondem aos peptídeos semelhantes à insulina inibindo esta via quando os miRNAs que o alvejam são sub-regulados, e, um dos efeitos desta inibição em moscas é o prolongamento do tempo de vida (DEMONTIS; PERRIMON, 2010; GRILLARI; HACKL; GRILLARI-VOGLAUER, 2010; WHEELER; BUCK; EVANS, 2006). Segundo BRITTON e colaboradores (2002), a deficiência na nutrição afeta a regulação da via IR/PI3K subregulando-a e isso é importante para uma resposta adequada a esse estresse. O gene *pten* é um antagonista direto de *pi3k* e pode regular negativamente tanto IIS quanto Egfr, desfosforilando PIP3 em PIP2. A super-expressão de reguladores negativos da IIS em *Drosophila*, como *dpten* ou

dFOXO, aumenta o tempo de vida das moscas; *pten* também causa elevada atividade antioxidante e longevidade em culturas de células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC) quando super-expresso, sendo estudado por seus efeitos na longevidade e tamanho das células tanto em nematoides quanto em moscas (HUANG et al., 1999; OGG; RUVKUN, 1998; OLDHAM et al., 2002; TAIT; LI; LU, 2015).

O papel dos miRNAs na regulação desta via foi demonstrado ao se estudar *DOR*, um dos co-ativadores do receptor de ecdisona (EcR) e alvo dos miRNAs 8, 14 e 34. *DOR*, um gene “pró-longevidade”, é antagonizado pela via de sinalização da insulina, havendo a possibilidade do miR-14 e do miR-34 atuarem, via miR-8, na regulação da sinalização da ecdisona via seus receptores (USP, EcR, que na presença de DOR afeta E74), impactando a atividade da via de IIS (FRANCIS; ZORZANO; TELEMAN, 2010; GARG; COHEN, 2014). No corpo gorduroso, a sinalização da insulina é inibida pela sinalização da ecdisona e a ativação dessa sinalização causa a redução da atividade de *pi3k* e aumento da atividade de *FOXO* (COLOMBANI et al., 2005; RUSTEN et al., 2004). Foi mostrado que em *Drosophila* o miR-8 regula a sinalização de IIS no corpo gorduroso larval, através do seu alvo *U-shaped* (USH), que inibe *pi3k* (HYUN et al., 2009).

Um fator de transcrição induzido por ecdisona chamado *eip74ef* (do inglês: *ecdysone-induced protein 74EF*) é regulado pelo miR-34 em *D. melanogaster* (BASAVARAJU; DE LENCASTRE, 2016; BIGAGLI et al., 2016; CHAWLA et al., 2016) e necessário para progressão do desenvolvimento nos estágios iniciais (CHAWLA et al., 2016). Estudos com mutações nos sítios de ligação preditos para miR-34 confirmaram que *eip74ef* é regulado negativamente por este microRNA, promovendo a longevidade e mantendo a homeostase neuronal (BASAVARAJU; DE LENCASTRE, 2016; CHAWLA et al., 2016). 20E e EcR regulam tanto o gene receptor de insulina

(*InR*) quanto o gene *eip74ef* (BERNARDO et al., 2014; GAUHAR et al., 2009). Este gene é muito utilizado como indicador da sinalização por ecdisona. Quando exposto ao 20E, os níveis de expressão de *InR* pouco se alteram enquanto que os de *eip74ef* aumentam consideravelmente (BERNARDO et al., 2014; MIRTH et al., 2014). Pouco se sabe sobre a modulação de 20E em indivíduos adultos de *A. mellifera* assim, há a possibilidade de uma análise criteriosa de *eip74ef* trazer informações relevantes sobre a função da ecdisona nesta fase da vida destas abelhas e sua relação com *InR*.

Em *A. mellifera*, o estado nutricional desempenha um papel crucial durante o desenvolvimento prematuro e tem a capacidade de transformar uma larva jovem em rainha fértil. Na vida adulta, a nutrição marca o cumprimento do polietismo etário, ou seja, o amadurecimento das operárias e sua passagem da fase de nutridora para forrageadora, de funções intra-nidais para o trabalho no campo. Neste momento, uma alimentação rica em proteínas é substituída por outra rica em carboidratos. Mas, este organismo oferece alternativas ao próprio modelo. Após se transformar em forrageadora, alterações sociais, ou seja, modificação da pirâmide demográfica dentro da colônia podem induzir estas abelhas mais velhas à volta ao estado de alimentadora. Estas abelhas voltam a sintetizar geleia real e assumem a alimentação das larvas, um fenômeno denominado plasticidade fenotípica. Esta plasticidade se reflete não só na fisiologia destas abelhas, mas também no comportamento e na via de sinalização de insulina. Segundo TOTH, 2005 há uma correlação negativa entre a armazenagem de nutrientes e a expressão de genes relacionados à insulina e assim, quando ocorre o aumento dos níveis de insulina, o armazenamento de lipídios diminui. Tal processo é dependente da idade da operária e desta forma pode-se dizer que a via de sinalização da insulina relaciona-se com a sensibilidade das forrageiras às mudanças nutricionais.

1.2 Papel dos microRNAs na regulação da via de insulina

Os microRNAs (miRNAs) compõem a maior parte do grupo dos pequenos RNAs não codificantes. Esse grupo é composto por uma variedade de RNAs reguladores como siRNAs e piRNAs. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores que possuem de 19 a 24 nucleotídeos de comprimento e cuja função canônica é a repressão de RNAs mensageiros (mRNA) alvos. A primeira descoberta dos miRNAs ocorreu em *C. elegans* e eles foram identificados como reguladores chave de genes que são responsáveis por diversos eventos de desenvolvimento (CALDERARI et al., 2017; LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993).

Os miRNAs são reportados por atuarem regulando as principais funções celulares, como proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional (AGUIAR et al., 2010)

Embora os mecanismos de regulação da expressão dos miRNAs, incluindo sua biogênese e modo de ação, ainda não tenham sido totalmente elucidados (BHAT; JARMOLOWSKI; SZWEYKOWSKA-KULÍŃSKA, 2016), sabe-se que a biogênese dos miRNAs envolve a sua transcrição no núcleo celular seguida da exportação para o citoplasma, para processamento e maturação (SINGH et al., 2008). A RNA polimerase II, que é uma enzima responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas, realiza a mediação da transcrição dos miRNAs, na maioria dos casos (COWLAND; HOTHER; GRØNBAEK, 2007; SCHMITTGEN, 2008; SUN; TSAO, 2008). Os transcritos primários de miRNA (pri-miRNA) assumem uma estrutura secundária denominada *stem-loop* (SUN; TSAO, 2008).

Um complexo, incluindo Drosha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita, processam os pri-miRNA no núcleo gerando assim os miRNAs precursores (pré-

miRNA) que são exportados para o citoplasma através da exportina-5 (SINGH et al., 2008). Um outra enzima, Dicer, processa os pré-miRNAs no citoplasma (SINGH et al., 2008) removendo a alça da estrutura *stem-loop* (SCHMITTGEN, 2008; SUN; TSAO, 2008; ZHANG; DAHLBERG; TAM, 2007), resultando na formação de um duplex de RNA (SCHMITTGEN, 2008; SINGH et al., 2008). O complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) incorpora esse duplex de RNA e separa as duas fitas de RNA (SUN; TSAO, 2008; ZHANG; DAHLBERG; TAM, 2007). Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro ao passo que a fita complementar sofre degradação (DALMAY, 2008; SCHMITTGEN, 2008; SUN; TSAO, 2008), mas pode também ser funcional (BARTEL, 2009).

Os dois principais mecanismos da regulação gênica por miRNAs dependem do grau de complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo. A complementaridade perfeita entre miRNA e mRNA alvo resulta na clivagem do alvo pelo complexo RISC; e a complementaridade incompleta inibe a tradução do mRNA alvo (HUTVAGNER, 2002; MELTZER, 2005; ZENG; YI; CULLEN, 2003). A região compreendida entre os nucleotídeos 2 e 8 na extremidade 5' do miRNA é chamada *seed*. Em geral, a complementariedade entre a *seed* do miRNA e a região 3' não-traduzida (do inglês *untranslated region*, 3'UTR) dos mRNAs é suficiente para inibir a tradução do mRNA (MACFARLANE; R. MURPHY, 2010).

Os miRNAs participam da modulação de diversos processos biológicos como regulação do metabolismo, diferenciação de adipócitos, desenvolvimento pancreático, biossíntese de insulina, secreção e sinalização. Os miRNAs também têm papel importante na regulação de várias funções celulares como proliferação celular, diferenciação, migração, invasão e apoptose (CALDERARI et al., 2017; CHEN et al., 2017).

Essas pequenas moléculas monitoram e respondem a mudanças ambientais, como temperatura e disponibilidade de nutrientes promovendo, preferencialmente, a inibição da tradução de mRNAs alvos e assim o tempo de vida e o desenvolvimento também apresentam uma complexa regulação pós-transcricional (BARTEL, 2009; LYNN, 2009; ROTTIERS; NÄÄR, 2012). Diversos aspectos do metabolismo são afetados pelos miRNAs, que respondem à presença de lipídeos, glicose e colesterol.(KATO; SLACK, 2013; LYNN, 2009; ROTTIERS; NÄÄR, 2012).

Os miRNAs foram mostrados, em recentes estudos, como integrantes das vias de sinalização sistêmicas, incluindo a via de insulina (CORONA; LIBBRECHT; WHEELER, 2016; KUSSMANN; STOVER, 2017; SHI et al., 2015) e diversas funções foram atribuídas aos miRNAs em insetos.

Os papéis dos miRNAs e de seus genes alvo em diversos organismos revelam as bases moleculares da deterioração cerebral durante o processo de envelhecimento e estudos do perfil de expressão de diversos miRNAs mostram que estes são modulados durante o envelhecimento. Os miRNAs foram implicados em distúrbios relacionados com a idade como neurodegeneração em humanos, ratos e moscas (DANKA MOHAMMED et al., 2017; GARG; COHEN, 2014).

Alguns miRNAs foram citados como reguladores ou possíveis reguladores da via da insulina em organismos como *D. melanogaster* e *A. mellifera*, principalmente em resposta ao *status* nutricional, com destaque para os miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 (ASHBY et al., 2016; SHI et al., 2015) (Figura 1). Estes atuam na via da insulina, em que o miR-14 regula a expressão de genes envolvidos na produção de insulina no cérebro de adultos (VARGHESE; LIM; COHEN, 2010), o miR-8 está envolvido na regulação do tamanho corporal (HYUN et al., 2009). Já o miR-34 é um

exemplo de miRNA que é regulado diferencialmente pelos hormônios 20E e HJ (ASHBY et al., 2016; MELLO et al., 2014).

Figura 1. Interações dos miRNA com genes da via de insulina. Interação das vias de sinalização e genes responsivos da via e miRNAs que foram objeto de estudo. Fonte: Modificado de GARG; COHEN, 2014.

Os miRNAs miR-14 e miR-8 também apresentam conexões moleculares entre as vias de sinalização da insulina e de ecdisteroides. Ambos são reprimidos por 20E e regulam negativamente a expressão de genes da via de insulina (HYUN et al., 2009; JIN; KIM; HYUN, 2012; VARGHESE; COHEN, 2007; VARGHESE; LIM; COHEN, 2010). Acredita-se que os miRNAs interagindo juntamente com as vias de sinalização hormonal e da insulina coordenam espacial e temporalmente diversos processos biológicos em insetos através da regulação da expressão gênica em níveis transcricionais e pós-transcricionais. (BASAVARAJU; DE LENCASTRE, 2016). Há indagações que ainda não foram respondidas: como os microRNAs, interagindo com

as vias da insulina e de ecdisteroides podem interferir no envelhecimento de abelhas *A. mellifera*?

1.3. As abelhas como modelo para estudos de envelhecimento

Cerca de 63% do total de eucariotos conhecidos é representado pelos insetos, possuindo mais de 1 milhão de espécies descritas, com estimativas que chegam a mais de 80 milhões de espécies. No que tange ao papel ecológico e recursos naturais, é evidente a sua importância, tanto na agricultura quanto na saúde humana (FOOTIT; ADLER, 2009). Como polinizadores, os insetos são responsáveis por polinizar aproximadamente 75% das espécies agrícolas (KLEIN et al., 2007), o que movimenta todos os anos, mundialmente, uma quantia de 153 bilhões de dólares (GALLAI et al., 2009). As abelhas *Apis mellifera* são apontadas como um dos polinizadores mais ativos, atingindo o patamar de polinização de 50% das espécies agrícolas no planeta (KLEIN et al., 2007), além de grande quantidade de plantas nativas. CCD, do inglês *Colony Collapse Disorder*, descreve o desaparecimento progressivo das abelhas em escala global e sem precedentes, principalmente da maioria das operárias, sem que haja vestígios de seus corpos próximos à colmeia (STOCKSTAD, 2007). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar os motivos responsáveis pela CCD, entre outras podemos citar: 1- introdução de espécies exóticas; 2 - uso de defensivos agrícolas; 3 - aquecimento global; 4 - parasitas (bactérias e fungos) e 5 - desnutrição (FAROOQUI, 2013; NAUG, 2009). Dessa forma, os estudos sobre abelhas e sobre sua nutrição apresentam muitas conexões e alta relevância. Desde a mencionada importância ligada à agricultura e alimentação humana, até a influência da desnutrição como potencial causa de seu desaparecimento; esses organismos ainda são excelentes modelos de estudo em

nutrigenômica pela forma como a dieta impacta suas vidas. O impacto destas variáveis sobre populações naturais de abelhas ainda não é conhecido.

A eussocialidade característica da espécie de abelhas *Apis mellifera*, inseto da ordem Hymenoptera (CULLINEY, 1983) que por possuírem metamorfose completa são chamados de holometábolos, está determinada pela existência de sistemas altamente eficientes de divisão de trabalho reprodutivo, sobreposição de gerações e indivíduos de uma mesma espécie capazes de contribuir com o trabalho da colônia e no cuidado da cria (WILSON, 1971, 2008). Os indivíduos desta espécie possuem ainda memória bem desenvolvida e alta capacidade de aprendizado e um sistema de orientação espacial sofisticado (HORRIDGE, 2009; MENZEL, 1985; MENZEL; GREGGERS; HAMMER, 1993; SRINIVASAN, 2011) constituindo, assim, interessantes modelos de estudo na biologia.

Nesta sociedade, a rainha é responsável pela reprodução que após a fecundação, bota ovos diploides. Estes ovos tem um período embrionário de 72 horas, em seguida ocorre a eclosão das larvas, as quais passam por quatro mudas. Tais mudas são caracterizadas por cinco estágios larvais (L1 a L5), etapas em que ocorre alimentação e crescimento intenso. A ontogênese prossegue após o estágio larval com uma muda metamórfica, iniciando a partir de então o período pupal, período em que a alimentação é interrompida e ocorre a troca dos tecidos larvais por tecidos adultos.

O sexo das abelhas é baseado no sistema haplo-diploide, isto é, dos ovos não fertilizados (haploides, $n=16$) emergem zangões, e dos ovos fertilizados (diploides, $2n=32$) emergem as fêmeas (NACHTSHEIM, 1916). Os zangões, único tipo de macho em uma colônia, tem como função a fecundação da rainha durante o voo nupcial. Nas fêmeas, por sua vez, ocorre a diferenciação em castas, operárias e rainhas,

dependendo da qualidade e quantidade do alimento recebido durante o desenvolvimento larval (BEETSMA, 1979; JUNG-HOFFMANN, 1966). Portanto, a nutrição diferencial é responsável pelo dimorfismo (FREE, 1980; REMBOLD; LACKNER; GEISTBECK, 1974). As rainhas são férteis, maiores e de maior longevidade, enquanto as operárias são facultativamente estéreis e executam tarefas de manutenção da colônia, tais como: cuidado com a prole, limpeza, forrageamento e guarda (PAGE; PENG, 2001).

O desenvolvimento embrionário dura três dias e as larvas que eclodem dos ovos, até o estágio L3, são alimentadas com geleia real, uma mistura de secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares de operárias adultas jovens (PIERRE, 1981). Após essa fase larval, as futuras rainhas mantêm sua alimentação com geleia real durante todo o período de desenvolvimento larval, e as futuras operárias são nutridas com uma mistura de mel, pólen e geleia real (MICHENER, 1969; revisado por FREE; MOUGA, 1980). Nessa alimentação casta-específica reside a base nutricional para o surgimento de organismos, sistemas nervosos e comportamentos diferentes a partir de um genoma bipotente. O teor de carboidratos da geleia real é quatro vezes maior do que o oferecido às larvas de operárias. Contudo, a razão glicose:frutose é praticamente a mesma nas duas secreções (ASENCOT; LENSKY, 1988). A geleia real é um alimento rico em carboidratos, vitaminas do complexo B, minerais, proteínas, lipídios e sais minerais (BENITEZ, 2000).

A ingestão de geleia real por larvas jovens desencadeia uma resposta neuroendócrina traduzida em altos títulos de hormônio juvenil (HJ), produzido por um par de glândulas localizadas no complexo retrocerebral, chamadas *corpora allata* (NIJHOUT; WHEELER, 1982; RACHINSKY; HARTFELDER, 1990; WHEELER, 1986). Estudos sobre os processos de diferenciação de castas mostravam que, sob níveis

diferentes de HJ, as larvas fêmeas experimentam trajetórias de desenvolvimento muito diferentes, culminando com o surgimento dos dois morfos adultos classicamente conhecidos nesta espécie, rainhas e operárias (RACHINSKY et al., 1990). Entre o terceiro e o início do quinto estágio larval, observa-se que os títulos de HJ são mais altos em rainhas do que em operárias de *A. mellifera*. (HARTFELDER; ENGELS, 1998; RACHINSKY et al., 1990). O HJ é considerado o fator endógeno decisivo que induz o desenvolvimento de larvas de abelhas *A. mellifera* em rainha (RACHINSKY; ENGELS, 1995). (Figura 2).

Figura 2. Perfis dos hormônios ecdisteróides e hormônio juvenil (HJ) durante o desenvolvimento pós-embriônico de castas de *Apis mellifera*. Fonte: BARCHUK et al., 2007.

O primeiro modelo para a determinação de castas em *A. mellifera* (Figura 3) considerando a contribuição de diferentes fatores para este processo, foi proposto por BARCHUK e colaboradores em 2007, fruto dos resultados de análises da expressão gênica diferencial durante o período crítico do desenvolvimento de operárias e rainhas obtidos mediante hibridação de *microarrays* de cDNA. O modelo propõe que a informação nutricional diferencial (mencionada anteriormente) é reconhecida pelo sistema nervoso estomatogástrico da larva e posteriormente transmitida ao cérebro e ao sistema endócrino, regulando a atividade dos *corpora allata* e o comportamento dos tecidos alvos através de moléculas da via insulina/IGF, secretadas pelas células

neurosecretores do cérebro larval (BOLELI; SIMÕES; HARTFELDER, 1998; WHEELER; BUCK; EVANS, 2006).

Um dos tecidos alvo da alimentação diferencial é o corpo gorduroso que recebe a informação nutricional através da hemolinfa. Em futuras rainhas, a geleia real resulta em altos níveis de ativação dos sistemas insulina/IGF e TOR, aumentando os níveis de síntese de HJ nos *corpora allata* e pode disparar o caminho de comunicação sistêmico mediado por subunidades de ácido-lábil (ALS) no corpo gorduroso. A “geleia de operária” afeta a via insulina/IGF de maneira menos evidente e pode não ser capaz de aumentar os níveis de HJ acima de um limiar específico (BARCHUK et al., 2007). O trabalho de CAMERON; DUNCAN; DEARDEN (2013) mostra a super-expressão de genes da via de síntese em rainhas.

Figura 3. Modelo geral da diferenciação de castas em *Apis mellifera*. A espessura da flecha indica o nível de ação relativa ao fator considerado. HJ: Hormônio Juvenil. Fonte: BARCHUK et al., 2007.

Em razão dos altos títulos de HJ, a expressão de genes fisiometabólicos é regulada positivamente. Em conjunto com nutrientes da geleia real, a expressão desses genes determina o padrão de crescimento corporal. Neste modelo, a

regulação positiva de *tor* em larvas de rainhas pode ser vista como um determinante da taxa de crescimento diferencial (BARCHUK et al., 2007; PATEL et al., 2007).

Estudos realizados em *Blattella germanica* evidenciam a relação funcional entre a atividade de *tor* e a síntese de HJ (MAESTRO; COBO; BELLES, 2009), o qual explicaria os elevados níveis de expressão de *tor* em larvas de rainhas e os simultâneos altos títulos deste hormônio. O HJ parece atuar determinando dois tipos de alterações no padrão de desenvolvimento: alterações que determinam um maior crescimento corporal da larva ou de campos específicos, especialmente dos ovários, e alterações de perda, pela rainha, de estruturas específicas, como o órgão coletor de pólen e as glândulas de cera, entre outras, que caracterizam as operárias (BARCHUK et al., 2007; BOMTORIN et al., 2012; MEDVED; HUANG; POPADIC, 2014). O HJ controla, provavelmente, a expansão do desenvolvimento neural, especificamente dos corpos cogumelares, resultando em um cérebro proporcionalmente maior em larvas de rainhas quando comparado com o de operárias (LUCHT-BERTRAM, 1961; MICHENER, 1974; MODA et al., 2013).

KAMAKURA (2011) demonstrou que uma proteína presente na geleia real, designada como “royalactina” (57 kDa), é uma das responsáveis por induzir a diferenciação de larvas de abelhas melíferas em rainhas. A quinase p70, responsável pelo aumento do tamanho do corpo e da atividade da proteína quinase ativada por mitógenos, é ativada por esta proteína e está envolvida na redução do tempo de desenvolvimento e no aumento dos títulos de HJ. Posteriormente, LEIMAR e colaboradores (2012) mostraram em seu trabalho que a alimentação da rainha é relativamente mais simples do que das operárias ao longo do desenvolvimento larval pois as operárias exigem um programa de alimentação que inclui fases com menor teor de açúcar e quantidades restritas de alimento. Tal diferença fornece uma pista

para a história evolutiva dos fenótipos de rainha e operária. Provando assim, de certa forma, que os açúcares são responsáveis pelo desenvolvimento em rainha.

O desenvolvimento em operária inclui a divisão de trabalho nesta casta e está relacionada com a idade das abelhas que, durante as primeiras semanas de vida, realizam tarefas apenas dentro do ninho, dentre as quais se destaca o cuidado com a prole, limpeza das células, criação dos imaturos, construção do favo de mel, desidratação do néctar, ventilação do ninho, cuidados com a rainha e com os machos, entre outras; e assim, nesta fase as operárias são chamadas de nutrizes. A partir da segunda ou terceira semana, as operárias (chamadas agora de forrageiras) passam a realizar tarefas fora do ninho que incluem a defesa do ninho (guardas) e a coleta de alimento no campo (néctar, pólen, água e resina) (BORDIER et al., 2017; SEELEY, 1995; WINSTON, 1987) (BORDIER et al., 2017; FISCHER; O'CONNELL, 2017; TEIXEIRA, 2016). Esta mudança de comportamento, dependente da idade e da organização social, é conhecida por polietismo etário.

Entre os fatores que regulam a divisão de trabalho das operárias estão os níveis de expressão da vitelogenina (Vg), uma proteína componente do vitelo, expressa de maneira significativa no corpo gorduroso das nutrizes que possuem um número reduzido de ovários, no entanto, potencialmente funcionais (BORDIER et al., 2017). Entre outras funções, que não aquelas ligadas à reprodução, a Vg promove uma maior longevidade das abelhas devido ao seu papel protetivo contra o estresse oxidativo, além de possuir uma importante função na regulação da maturação comportamental (SEEHUUS et al., 2006). Ainda que as operárias já possuam um número reduzido de ovários estes sofrerão durante a fase de forrageira um forte processo de morte celular, que reduzirá ainda mais o número destas unidades dos ovários (Revisto por RONAI et al., 2017). Este processo pode estar envolvido nos mecanismos que

controlam a divisão temporal do trabalho (AMDAM et al., 2004; TURILLAZZI; WEST-EBERHARD, 1996). As vias do HJ, Vg e insulina têm efeitos na diferenciação de castas e na divisão do trabalho entre operárias (AMDAM et al., 2004; AMENT et al., 2008; LATTORFF; MORITZ, 2013) e os seus níveis diferem de acordo com a casta, variando através do tempo de vida das abelhas adultas. Entre o segundo e o quarto dia de vida da abelha adulta é mostrado um sutil aumento nos títulos de HJ, permanecendo extremamente baixos nas duas primeiras semanas da vida adulta, quando aumentam gradualmente até que atingem o seu pico quando operárias param de realizar suas tarefas no ninho e passam a forragear. Os níveis de Vg, no entanto, tem seu pico em abelhas jovens (± 10 dias) dando início, a partir de então, a um decaimento até os níveis ficarem indetectáveis em forrageiras (Figura 4) (AMDAM et al., 2004; HUANG et al., 1991; NILSEN et al., 2011; ROBINSON, 1987; RUTZ et al., 1976; WANG et al., 2012).

Figura 4. Níveis de Hormônio Juvenil e Vitelogenina em abelhas adultas. Gráfico esboçando os níveis de vitelogenina e hormônio juvenil em diversos estágios da vida adulta em *Apis mellifera*. RN: recém-nascida, N: nutriz, F: forrageira, HJ: Hormônio Juvenil, VG: Vitelogenina.

A expressão dos genes de sinalização da insulina, incluindo os peptídeos semelhantes à insulina e seus receptores, é maior nas forrageiras do que nas nutrízes

neste mesmo período (AMENT et al., 2008; CORONA et al., 2007; WANG et al., 2013), sendo portanto, fortes candidatos ao controle da transição nutriz-forrageira.

Diversas mudanças podem provocar a transição entre as nutrizes e forrageiras e tais mudanças são observáveis na expressão diferencial de genes específicos, nas atividades neuroquímicas e endócrinas e até mesmo, na estrutura do cérebro (ROBINSON, 2002). Em resposta às mudanças na colônia ou às condições ambientais tais como: alteração do número de nutrizes e forrageiras (HUANG; ROBINSON, 1996; LEONCINI et al., 2004; PANKIW, 2004), infecção por parasitas (GOBLIRSCH; HUANG; SPIVAK, 2013), fome (SCHULZ; HUANG; ROBINSON, 1998), alterações na expressão de genes relacionados com o comportamento alimentar (AMENT et al., 2008), etc, as operárias podem acelerar, retardar e até mesmo reverter seu comportamento, dessa forma a divisão do trabalho pode sofrer alterações, mais uma comprovação da plasticidade fenotípica (LEONCINI et al., 2004; ROBINSON; HUANG, 1998).

Um exemplo de estímulo que pode influenciar na capacidade das abelhas alterarem seu comportamento seria a remoção de forrageiras de uma colônia o que estimula as abelhas mais jovens a começarem a busca precoce por alimentos fora do ninho (algumas abelhas começam a forragear aos cinco dias de idade), enquanto que a adição de forrageiras promove o efeito contrário (TEIXEIRA, 2016). Segundo BORDIER e colaboradores (2017), diversos estudos mostram que distúrbios na colônia, infecção por parasitas e fome levam ao aumento da produção de hormônio juvenil (HJ) e isso faz com que ocorra o forrageamento precoce. O contrário também acontece caso as nutrizes sejam retiradas do ninho, o efeito seria a reversão de forrageiras ao *status* de nutrizes. A transição entre essas duas fases da abelha adulta também está relacionada com diversas mudanças tais como: mudanças na expressão

gênica, nas atividades neuroquímicas e endócrinas e na estrutura do cérebro (BORDIER et al., 2017; TEIXEIRA, 2016).

Segundo MENGONI GOÑALONS e colaboradores (2016), o início da idade de forrageamento é afetado pelo estresse nutricional da colônia e também é correlacionado com alterações na expressão de genes relacionados com o comportamento alimentar. A via da insulina regula tais mudanças no estado nutricional e desempenha um papel importante nas mudanças comportamentais, de acordo com o envelhecimento das operárias e são provavelmente mediadas através de sinais sociais. A expressão de genes relacionados à insulina está negativamente correlacionada com a armazenagem de nutrientes, ou seja, os níveis de insulina aumentam quando o armazenamento de lipídios diminui, de acordo com o polietismo etário. Pode-se então dizer que a via de sinalização da insulina relaciona-se com a sensibilidade das forrageiras às mudanças nutricionais.

Segundo BORDIER e colaboradores (2017), a transição de nutrízes para forrageiras está associada com diversas mudanças fisiológicas que incluem a perda da metade da reserva de lipídios abdominais e a resposta ao estresse pode variar de acordo com o estado comportamental das abelhas. TRAPP, MCAFEE E FOSTER (2017) relatam um papel importante da metilação do DNA e dos miRNAs na transição nutrízes para forrageiras e na determinação de castas.

1.4. Justificativa

A plasticidade fenotípica, uma instigante característica das abelhas, fez deste organismo um importante modelo para estudos relacionados a variações no tempo de vida e manifestações do processo de envelhecimento. Processos particularmente interessantes em ambas as castas, rainhas e operárias (AMDAM; PAGE, 2005; CORONA et al., 2007; JEMIELITY et al., 2005; KELLER; JEMIELITY, 2006;

RUEPPELL; KAFTANOUGLU; PAGE JR., 2009). As abelhas de um modo geral, e em particular, *Apis mellifera*, desempenham papel de destaque quando fatores ecológicos e econômicos são considerados, (RUEPPELL; AUMER; MORITZ, 2016), além disto, e ainda mais importante é a conservação de vias moleculares, como a via que regula o ciclo circadiano, por exemplo, e como notamos que é o caso da via da insulina. A conservação de componentes da via de insulina, permite o uso das abelhas como um bom modelo para análises genômicas, inclusive comparações com o genoma humano.

Além disso, por apresentar características que permitem a realização de investigações abrangentes relacionadas às ciências naturais e da saúde, incluindo as áreas comportamentais, moleculares, morfofisiológicas e genéticas, o modelo biológico *Apis mellifera* vem sendo amplamente estudado. Este organismo teve seu genoma sequenciado por um consórcio internacional (THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006), o que gerou mais atenção e interesse dos pesquisadores. A partir de então houve um aumento no volume de trabalhos relacionados à genética do inseto, oferecendo alternativas aos estudos que relacionam a influência do meio externo sobre a atividade gênica. Estes estudos são favorecidos pelas próprias características dos Hymenoptera e sua relação com o meio ambiente.

As abelhas são insetos com comportamentos e interações sociais quantificáveis em condições naturais, características que servem como modelo para pesquisas relacionadas ao estresse (RUEPPELL et al., 2017); no entanto, ainda que relacionados ao envelhecimento e à mortalidade estas interações não são frequentemente abordadas experimentalmente (AMDAM, 2011). A comparação de diversas espécies nos permite dizer que o tempo de vida é altamente variável (JONES

et al., 2013). A taxa de variação do tempo de vida dentro de uma mesma espécie é muito menor, embora em insetos sociais a variação entre rainhas e operárias seja bem ampla (KELLER; GENOUD, 1997; KRAMER; SCHAIBLE, 2013). A vida da operária depende de fatores intrínsecos, extrínsecos e populacionais, tais como: tamanho corporal e taxa metabólica (CALABI; PORTER, 1989; CHAPUISAT; KELLER, 2002), temperatura e sazonalidade (CALABI; PORTER, 1989), tamanho da colônia e divisão de tarefas (BOURKE, 1999; RUEPPELL et al., 2007; RUEPPELL; KAFTANOUGLU; PAGE JR., 2009; TOFILSKI, 2006; WOYCIECHOWSKI; MORÓN, 2009). Os insetos sociais tornam-se, dessa forma, ótimos modelos para pesquisas acerca do envelhecimento, possibilitam amplas comparações interespecíficas e análises genômicas globais (KRAMER; SCHAIBLE, 2013). Há poucas informações literatura sobre as possíveis causas e mecanismos envolvidos nos processos de envelhecimento e senescência, além disto, estão restritas a poucos organismos modelo (KORB, 2016), assim é interessante aprofundar os estudos em insetos como *Drosophila melanogaster* e abelhas *Apis mellifera*.

Ao contrário de vespas e mamangavas que dependem da sobrevivência do fundador, as abelhas *Apis mellifera*, aqui considerando a colônia como um organismo, são resistentes a temperaturas rigorosas como o frio, quando toda a colônia e não apenas um indivíduo sobrevive. Diversas adaptações devem ocorrer a fim de permitir que este evento ocorra, como as relacionadas ao armazenamento de carboidratos utilizados na produção de calor pela colmeia (SEELEY, 1995; WINSTON, 1987) garantindo assim que a colônia sobreviva uma vez que sob frio intenso não ocorre o forrageamento e novas crias não são produzidas para renovação das operárias. Portanto, é necessário que indivíduos sobrevivam até que novas operárias sejam produzidas. O tempo de vida pode ser encurtado ou prolongado de acordo com a

produção de peptídeos semelhantes à insulina nas células neurosecretoras (IPC) como observado no cérebro de moscas (GARG; COHEN, 2014).

Propusemos com este trabalho contribuir para o entendimento de questões relacionadas à modulação e/ou regulação por miRNAs na via da insulina, nos processos de envelhecimento de abelhas *A. mellifera* adultas. A proposta baseou-se na hipótese de que a interação da via da insulina com os miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 regule processos biológicos em diferentes momentos da vida adulta de operárias. Dessa forma, é possível que esses miRNAs atuem equilibrando as atividades dessas vias e estariam implicados no envelhecimento.

Assim, avaliamos a expressão de microRNAs específicos na regulação de genes da via insulínica, durante o processo de envelhecimento de operárias de *A. mellifera*, bem como analisamos de que forma estes genes se comportam em condição de orfandade, evento que mantém a capacidade reprodutiva destas operárias, consequentemente, impedindo a senescência de diferentes processos.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a modulação de genes da via de insulina (*pten*, *chico*, *pi3k*, DOR, *eip74ef*) e dos microRNAs candidatos (miR-8, miR-14 e miR-34) durante o processo de envelhecimento de operárias de *A. mellifera*, na transição nutriz-forrageira e na condição de orfandade.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos avaliamos e analisamos:

- Os níveis dos transcritos dos genes *pten*, *chico*, *pi3k*, DOR, *eip74ef* bem como dos miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 no processo de transição nutriz-forrageira

de operárias adultas de *A. mellifera* por meio de análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase (qPCR).

- A morfologia do corpo gorduroso ao longo da vida adulta de operárias mantidas em colônias padrão e em operárias mantidas em colônias órfãs
- A expressão dos genes *pten*, *chico*, *pi3k*, DOR, *eip74ef* bem como dos miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 no processo de transição nutriz-forrageira de operárias adultas de *A. mellifera* por meio de análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase (qPCR) em operárias mantidas em condição de orfandade.

3. Material e Métodos

3.1 Caracterização da via de insulina e dos miRNAs reguladores em *Apis mellifera*

3.1.1 Anotação os genes e desenho dos *primers*

Os genes de interesse foram anotados utilizando como base o arquivo FASTA disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do *software* Artemis, v. 15.0.0 (RUTHERFORD et al., 2000).

Os sítios de ligação preditos também foram anotados, permitindo assim o desenho de *primers* (Tabela 1) que flanqueiam a 3'UTR que contém estes sítios com o auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

Tabela 1. Relação dos genes e respectivos *primers*, bem como miRNAs utilizados para amplificação das amostras.

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>pi3k</i>	5'-CTGGTGGAAGACCACTTGCT-3'	5'-TACCAGGTCCAGCACAATCA-3'
<i>pten</i>	5'-GAAGATGGGGAATCTGGTGA-3'	5'-TCCCCACGTGAGAGTAAACC-3'
<i>chico</i>	5'-ACCAGCGAAAGTCATCCAAC-3'	5'-GAGATTGGCGGTGAATAGGA-3'
DOR	5'-ATCCTCATTGACCGTGCTGT-3'	5'-CGGACATACTGGGATGCTCT-3'
<i>e74</i>	5'-CTGGCGTCTCATCTTCTCA-3'	5'- TCCCTCTATGCGGATGGTA-3'
<i>rpl32</i>	5'- CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3'	5'- TTGAGCACGTTCAACAATGG-3'
miR-8	5'-TAATACTGTCAGGTAAAGATGTC-3'	Universal Primer NCode Kit
miR-14	5'-TCAGTCTTTTCTCTCTCCTA-3'	Universal Primer NCode Kit
miR-34	5'-TGGCAGTGTTGTTAGCTGGTTG-3'	Universal Primer NCode Kit
miR-252b	5'-TTAAGTAGTAGTGTCTAGATGA-3'	Universal Primer NCode Kit

3.1.2 Predição dos miRNAs reguladores dos genes da via de insulina

As interações miRNA-mRNA em *A. mellifera* foram preditas através da busca por sítios de ligação para miRNAs na 3'UTR dos genes escolhidos, utilizando o programa *RNAhybrid* (KRUGER; REHMSMEIER, 2006; REHMSMEIER et al., 2004). Foram utilizados na busca apenas os miRNAs de interesse, isto é, buscamos pelo miR-8, miR-14 e miR-34 que foram depositados no miRBase. Uma região de 1000 nt à jusante (*downstream*) do códon de parada nos genes de *A. mellifera* foi recuperada (versão 4.5, THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2006) para ser usada como 3'UTR, pois a anotação de regiões não traduzidas de *A. mellifera* não está completa. Como critério, apenas as predições com energia livre ≤ -20 kcal/mol e

p-value $\leq 0,05$ foram consideradas utilizando o programa *RNAhybrid*. Uma rede de interação miRNA-mRNA foi construída a partir do programa Cytoscape 3.6.1.

3.2 Perfil de expressão dos genes da via de insulina e dos miRNAs candidatos a reguladores

3.2.1 Coleta do Material Biológico

Para a obtenção do material biológico foram coletados, através de dissecação, cérebros e corpo gorduroso de abelhas operárias de *A. mellifera* nas seguintes idades: recém emergidas, 5 dias, 10 dias, 15 dias e 20 dias após a emergência. As amostras do organismo modelo foram coletadas do Apiário Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo. Para este projeto foram utilizadas abelhas em condições normais e abelhas em condições de orfandade nas idades descritas.

3.2.2 Dissecação do material

Dessas abelhas dissecamos cérebros e corpos gordurosos em solução salina (NaCl 0,9 %) preparada com água DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase) estéril e gelada. Para tal etapa foram necessárias micro-pinças, alfinetes esterilizados, lupa, Placa de Petri com parafina e pipetas. As abelhas foram colocadas sobre uma placa de Petri e afixadas com o auxílio dos alfinetes e a região cefálica e abdominal foram cobertas pela solução salina. O processo de dissecação segue-se da seguinte forma: retira-se as cutículas que revestem a cabeça das abelhas e o abdômen, as antenas e os dois lóbulos óticos e a probóscide, deixando apenas a região contendo o cérebro e os ocelos. Os ocelos são então desprendidos da região cerebral e porções dos corpos gordurosos são retiradas, finalizando assim a dissecação. Dois cérebros foram inseridos em microtubos de 1,5 mL, cada um contendo 20 μ L de solução salina. Posteriormente foram acrescentados 200 μ L do reagente TRIzol® (Invitrogen) e em

seguida congelado em freezer (-80°C) até o momento da extração do RNA total. O mesmo foi realizado com os corpos gordurosos provenientes das abelhas, porém neste caso utilizou-se 500 µl de TRIzol.

3.2.3 Extração do RNA total

Para a extração de RNA total, tanto de cérebro quanto de corpo gorduroso, foi utilizado o reagente TRIzol® de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen). Os *pellets* de RNA total foram redissolvidos em 20 µL de água DEPC. Desta solução, 1 µL foi utilizado para determinar a concentração em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) em comprimento de onda igual a 260 nm. Posteriormente foi realizada uma padronização do RNA total a ser utilizado, visando uma massa final de 2 µg em 8 µL de água bidestilada para seguir com a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.2.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, cada amostra foi tratada com DNase livre de RNase e 1 µL de tampão 10x, por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir adicionou-se 1 µL de EDTA (25mM) incubando em termociclador por um período de 10 minutos a 65°C, processo necessário para inativação da enzima (DNase). Em seguida adicionamos 1 µL de Oligo dT, 1 µL de dNTP mix (10mM) com 5 minutos a 65°C. Após isto, acrescentou-se 4 µL de 5x First Strand Buffer, 2 µL de DTT e 1 µL de RNaseOUT (*Recombinant Ribonuclease Inhibitor*). As amostras foram incubadas no termociclador por 2 minutos a 42°C. Posteriormente, adicionou-se 1 µL de RT (*Reverse Transcriptase*) em cada amostra, e estas foram incubadas no termociclador, por 50 minutos a 42°C. A obtenção de cDNA findou-se após as amostras terem ficado por 15 minutos no termociclador a 70°C, para que ocorresse a inativação da reação.

3.2.5 PCR convencional e eletroforese para avaliação da eficiência dos *primers*

Foi realizada uma PCR convencional a fim de verificar se a temperatura de pareamento para qual o *primer* foi desenhado atendia ao esperado. Nesta etapa verificou-se também se o produto da amplificação é único. Para realizar a PCR convencional adicionou-se 10 µL do reagente PCR Master Mix 2x (Promega), 7,4 µL de água milliq, 0,8 µL do *Reverse primer*, 0,8 µL do *Forward primer* e 1 µL de cDNA. As amostras foram então colocadas no termociclador variando o número de ciclos e a temperatura de pareamento de acordo com cada par de *primer*. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1% em tampão SB corado com UniSafe. O tamanho do fragmento amplificado foi comparado ao Ladder de 100pb. Os *primers* foram desenhados para amplificarem fragmentos de aproximadamente 130 pb.

3.2.6 Perfil de expressão dos genes da via de insulina e dos miRNAs candidatos a reguladores

As análises dos níveis de transcrição dos genes de interesse e dos miRNAs candidatos foram realizadas por meio de qPCR utilizando-se Power SYBR® Green (Applied Biosystems) no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems).

Foram analisadas 5 amostras biológicas em triplicata técnica (5 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas). O gene da proteína ribossomal L32 (*rp132*) foi utilizado como normalizador para os genes (LOURENÇO et al., 2008) e o miR-252b para os microRNAs. As condições de reação foram as seguintes: em cada poço foram colocados 7,4 µL de água MilliQ estéril, 10 µL de SYBR® Green Real Time PCR Master Mix, 0,8 µL de *Forward primer* (10 µM), 0,8 µL de *Reverse primer* (10 µM) e 1 µL do cDNA da amostra, totalizando 20 µL. A reação foi programada com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C e 2 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C e um ciclo final de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C

e 15 segundos a 95 °C (*melt curve stage*). As análises dos níveis de transcritos foram feitas de acordo com a metodologia de $\Delta\Delta C_t$ comparativo formulada por PFAFFL et al., 2004, em que foi utilizado um nível de significância $p \leq 0,05$ (test t de Student) a fim de comparar e analisar os níveis dos transcritos entre as amostras controle e pós-orfandade. As análises estatísticas para um mesmo grupo (controle e órfãs) foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad PRISM v. 6.0 (*One way ANOVA*) e para comparação entre os grupos, *Two way ANOVA*.

Para verificarmos como se comportam os genes *pten*, *chico*, *pi3k*, *DOR*, *e74* e miRNAs miR-8, miR-14 e miR34 no processo de transição nutriz-forrageira durante o envelhecimento de operárias adultas de *A. mellifera* em condição de orfandade, um ninho padrão foi usado nesta segunda fase do experimento do qual foi removido a rainha para que as operárias forrageadoras regredissem ao status de nutridoras ou permitindo estas últimas se tornarem poedeiras. Uma das formas que utilizamos para avaliar os efeitos orfandade, foi analisando o perfil de expressão dos genes e miRNAs candidatos, no corpo gorduroso de operárias recém-emergidas, com 5 dias, 10 dias, 15 dias e 20 dias de vida, possivelmente poedeiras. Os controles foram coletados antes do ninho ser levado à condição de orfandade. Portanto, as abelhas nas duas condições eram irmãs.

3.3 Avaliação da morfologia do corpo gorduroso em condição normal e condição de orfandade

Desenvolvemos um protocolo tentativo para análise das células do corpo gorduroso, enócitos e trofócitos. Para isto, coletamos amostras de corpo gorduroso do terceiro tergito abdominal de operárias nas mesmas idades e condições dos experimentos acima descritos. O material foi fixado em paraformaldeído e corado com DAPI e Faloidina, seguindo protocolo já estabelecido em nosso laboratório. As lâminas

foram, em seguida, observadas e documentadas com auxílio de um Microscópio confocal (Leica® TCS SP5).

4. Resultados e discussão

4.1 Reconstrução de redes de interação gênica

No presente trabalho percorremos todas as etapas, desde a anotação dos genes, predição dos miRNAs que interagem com esses genes e reconstrução de uma rede de interação até o perfil de transcrição desses genes e miRNAs.

Para identificar possíveis interações miRNA-RNA, realizamos análises *in silico* para verificar a estrutura desses genes através da anotação dos mesmos utilizando o *software* Artemis v. 15.0.0, permitindo assim o desenho de *primers*. Os sítios putativos de ligação dos miRNAs, miR-8, miR-14 e miR-34 foram preditos utilizando o *software* RNAhybrid. Através do programa Cytoscape foram reconstruídas redes de interações entre os genes e miRNAs alvos do estudo (Figura 5).

Figura 5. Rede de interação miRNA-mRNA alvo. Rede de interação entre os miRNAs e seus alvos reconstruída através da predição de interação pelo *software online* RNAhybrid e graficamente desenhada através do programa Cytoscape.

Os genes *DOR*, *pi3k* e *e74* interagem claramente com miR-34 e miR-8. miR-14 não retornou resultados positivos em nossas análises. E ainda, os parâmetros

restritivos usados em nossas análises não permitiram observar interações dos miRNAs candidatos com os genes *pten* e *chico*.

4.2 Análise de qualidade e validação dos *primers*

Para uma análise mais robusta dos resultados obtidos, optamos por utilizar 5 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas para cada idade e condição experimental. Realizadas as devidas checagens de integridade, em que constatamos que os fragmentos amplificados, não só tinham o tamanho esperado, como também, um único fragmento de 130 bp (Figuras 6 e 7), prosseguimos com a análise por qPCR dos genes *pi3k*, *chico*, *pten*, DOR e *e74*, bem como dos miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 em que as abelhas foram mantidas em suas colônias de origem sem que houvesse qualquer interferência, ou seja, em condições normais.

Figura 6. Experimentos de PCR convencional e análise em gel de agarose para otimização dos *primers* descritos na Tabela 1. Foi utilizado como normalizador, o gene *rp32*. Eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador:100pb. BR: cérebro; FB: Corpo Gorduroso; CON: Controle. Número antes de BR ou FB indica idade. Fator de diluição: 10x ou 5x.

Figura 7. Análise dos produtos de PCR para verificação da eficiência dos *primers* desenhados para amplificação de *chico*, *pi3k* e *pten*. Eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador:100pb. Temperaturas 58° C e 60° C. B: Branco

4.3 Análise da morfologia das células do corpo gorduroso

Antes da dissecação dos indivíduos para extração de RNA, dissecamos parte do corpo gorduroso do terceiro tergito para análises anteriores da morfologia deste tecido usando como corantes DAPI e Faloidina e microscopia confocal de fluorescência (Microscópio Leica TCS SP5).

Dois tipos de células constituem o corpo gorduroso em abelhas *Apis mellifera*: os trofócitos, de origem mesodérmica e os enócitos, de origem ectodérmica (OLIVEIRA; CRUZ-LANDIM, 2003; SNODGRASS, 1935). Os trofócitos são grandes e irregulares, e os enócitos são pequenos e esféricos (HSIEH; HSU, 2011). Estas células desempenham diferentes funções neste órgão e algumas vezes têm resposta antagônicas ao mesmo estímulo (TSAKIRI et al., 2013) embora pertencentes ao mesmo órgão. Acredita-se que os trofócitos desempenhem um papel local no metabolismo intermediário ao produzir e armazenar lipídios, carboidratos e proteínas (KEELEY, 1985; LOCKE, 1984; WIGGLESWORTH, 1942), que diferem em

quantidade e qualidade durante o desenvolvimento (DA CRUZ-LANDIM, 1983; DEAN; LOCKE; COLLINS, 1985; HAUNERLAND; SHIRK, 1995; LOCKE; COLLINS, 1968; MARX, 1987). Já os enócitos podem desempenhar um papel na produção de lipídios ou lipoproteínas, função evidenciada pela presença de um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido (CRUZ-LANDIM, 1985; KSIAZKIEWICZ KAPRALSKA, 1984; LOCKE, 1969). Há evidência de que os enócitos de alguns insetos secretam ecdisteróides que regulam várias funções durante o desenvolvimento e a reprodução (ROMER; EMMERICH; NOWOCK, 1974). Essas células têm sido estudadas a fim de se compreender a senescência celular devido às suas funções biológicas como tecido adiposo branco, facilidade de isolamento do abdômen, manipulação conveniente e número fixo durante a vida adulta, ou seja, são células pós-mitóticas (CHAN et al., 2011; HSIEH; HSU, 2011; MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014; SEEHUUS et al., 2013).

Algumas chaperonas como Hsp70 e Hsp 22 sofrem alterações ao longo do desenvolvimento e envelhecimento. Em alguns enócitos foram observadas alterações em Hsp22 (TOWER et al., 2014). Durante o processo de envelhecimento há uma mudança na composição e função dos enócitos (FEDINA et al., 2012) e o acúmulo de pigmentos decorrentes desse processo emprestaram nome ao enócitos, oenos, do grego, vinho. Este mesmo processo é observado no fígado dos mamíferos, cujos hepatócitos guardam semelhanças com os enócitos e também acumulam pigmentos marrons ao longo do envelhecimento (JUNG; HÖHN; GRUNE, 2010). Dessa forma, não só os pigmentos funcionariam como biomarcadores do envelhecimento nestas células, mas também as alterações na chaperona Hsp22, o que explicaria as falhas nos padrões mitocondriais observadas durante o envelhecimento (TOWER et al., 2014).

Células subepidérmicas apresentam uma notável semelhança em insetos (enócitos dos adultos), aves (células glandulares) e mamíferos (sebócitos) as quais secretam complexas misturas de lipídeos no tegumento, que desempenham importantes funções de barreira (MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014). Há uma clara similaridade entre os lipídeos da pele dos humanos com os lipídeos dos insetos, assim, pergunta-se: Será que estes lipídeos derivados podem influenciar a longevidade nos mamíferos, tal como ocorre em *Drosophila*?

Os enócitos estão intimamente ligados ao metabolismo dos lipídeos (MAKKI; CINNAMON; GOULD, 2014) e com a alimentação, ou seja, na presença de nutrientes, tais células sofrem crescimento celular dependente de *pi3k* e possuem poucas gotículas de lipídeos. Em períodos em que não há nutrientes, contrariamente, os enócitos diminuem a sinalização *pi3k*, suspendendo o crescimento celular e apresentam acúmulo de gotículas lipídicas em abundância (CINNAMON et al., 2016).

Pi3k sofre elevação de seus níveis diante de uma variedade de fatores nutricionais e do crescimento (CANTLEY, 2002) e análises genéticas revelaram que os enócitos respondem à nutrição e a *pi3k* de forma diferente à observada no corpo gorduroso (trofócitos). *Pi3k* estimula o acúmulo de lipídeos neutros nas células do corpo gorduroso mas inibe este processo nos enócitos (CINNAMON et al., 2016). A comparação entre os resultados obtidos por qPCR com os resultados da quantificação dos grânulos, para concluir sobre os efeitos da dieta e ou da idade, é uma decisão complexa, por alguns motivos. Os valores obtidos nos experimentos de PCR representam a somatória da expressão nas diferentes células do corpo gorduroso e a quantificação dos grânulos foi restrita aos enócitos. Além disto, devemos ter em mente que diante de determinados estímulos, os enócitos emitem respostas antagônicas às

dos trofócitos. Assim, embora muito promissoras, decidimos apresentar as análises morfológicas do corpo gorduroso, apenas como resultados preliminares.

Nas imagens obtidas através de microscopia confocal de fluorescência, pudemos observar a alteração da morfologia dos enócitos e trofócitos de acordo com a alteração natural da alimentação das abelhas ao longo da vida adulta. Notamos um achatamento dos núcleos dos trofócitos devido ao aumento da atividade de síntese e armazenamento nestas células. Os enócitos também se modificam ao longo do desenvolvimento e envelhecimento. O que se pode notar, analisando a sua morfologia, foi uma modificação na distribuição dos grânulos citoplasmáticos, bem como na quantidade. (Figura 8).

Observamos também que nem todos os enócitos se comportam da mesma maneira quanto a produção e armazenamento de lipídios, funções evidenciadas pela presença dos grânulos, o que reforça a suspeita de diferenças entre os próprios enócitos (ROMER; EMMERICH; NOWOCK, 1974). Tais grânulos foram mensurados utilizando o *software* Image J na versão Fiji. Utilizamos apenas o canal vermelho (coloração da faloidina) para realizar a mensuração da área ocupada por esses grânulos (Tabela 2, Figuras 9 e 10). Ainda que o número e distribuição dos grânulos do citoplasma tenham se modificado nestas células, ainda não sabe o significado dos mesmos ou desta alteração.

Os resultados obtidos das análises realizadas no Image J parecem ser consistentes uma vez que as medidas se limitam aos enócitos, eliminando o efeito sobre os trofócitos, ao contrário dos resultados dos experimentos de qPCR, que quantificam a expressão em ambas as células. Assim, os resultados de amplificação gênica no corpo gorduroso seria uma média de ambos os tipos celulares. A análise da presença destes grânulos no citoplasma dos enócitos durante a vida adulta das

operárias, em duas condições, com e sem rainha, mostra de maneira clara uma alteração no número e distribuição dos mesmos. O que deveríamos esperar seria um aumento no número destes grânulos ao longo da vida adulta das operárias mantidas em colônias com rainhas, a partir do momento em que estas abelhas mudam o comportamento e alimentação, passagem de nutriz para forrageira.

Figura 8. Análise da morfologia das células do corpo gorduroso de do corpo gorduroso de *Apis mellifera*, coradas por DAPI (azul) e Faloidina (vermelho). Imagens: Microscópio confocal Leica SP5. Células arredondadas são os enócitos (setas amarelas) e células com núcleos mais achatados, trofócitos (setas verdes). RN: Recém-nascida, 05/10/15/20D: Dias após nascimento, CR: Com rainha, SR: Sem rainha.

Figura 9. Gráfico referente às mensurações realizadas no *software* Image J utilizando os dados de área total dos grânulos dos enócitos de *A. mellifera* mostrados na tabela 2. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Tabela 2. Resultados obtidos das mensurações realizadas em enócitos de *A. mellifera*. Slice: Idade e Condição da amostra, Contagem: Número de partículas contadas, Área Total: Área total ocupada pelos grânulos em mm², Tamanho médio: Tamanho médio dos grânulos, %Área: Porcentagem da área ocupada, Média: média do tamanho dos grânulos, DenInt: Densidade ótica.

Slice	Contagem	Área Total	Tamanho médio	% Área	Média	DenInt
RN	3523	3.355	9,52E-01	2.948	254.432	0.231
RN	3926	4.222	0.001	3.710	254.478	0.264
RN	5174	3.855	7,45E-01	3.388	254.612	0.186
5d CR	15909	5.717	3,59E-01	5.025	254.579	0.086
5d CR	26552	8.741	3,29E-01	7.682	254.518	0.080
5d CR	19953	6.091	3,05E-01	5.353	254.658	0.075
10 CR	7323	3.099	4,23E-01	2.724	254.584	0.104
10 CR	6794	4.803	7,07E-01	4.221	254.271	0.163
10 CR	4171	4.854	0.001	4.266	253.925	0.247
15 CR	1445	0.729	5,05E-01	0.641	254.829	0.128
15 CR	1707	1.488	8,72E-01	1.308	254.745	0.220
15 CR	986	0.831	8,43E-01	0.730	254.533	0.213
20 CR	3176	1.416	4,46E-01	1.245	254.798	0.113
20 CR	3950	1.981	5,02E-01	1.741	254.825	0.127
20 CR	3944	1.662	4,22E-01	1.461	254.817	0.106
5d SR	5226	1.573	3,01E-01	1.383	254.828	0.076
5d SR	5873	2.137	3,64E-01	1.878	254.757	0.092
5d SR	6675	2.293	3,44E-01	3.714	254.728	0.082
10 SR	2061	1.512	7,34E-01	1.329	254.808	0.186
10 SR	2660	1.580	5,94E-01	1.388	254.662	0.149
10 SR	3497	1.432	4,10E-01	2.277	254.335	0.100
15 SR	3226	2.085	6,46E-01	1.832	254.589	0.162
15 SR	2537	1.368	5,39E-01	1.203	254.699	0.136
15 SR	3584	2.335	6,52E-01	2.052	254.382	0.156
20 SR	1282	0.798	6,22E-01	0.701	254.703	0.157
20 SR	1279	1.241	9,70E-01	1.090	254.661	0.245
20 SR	1076	0.502	4,66E-01	0.441	254.696	0.117

Figura 10. Processamento de imagens pelo programa Image J, para mensuração da área ocupada pelos grânulos do citoplasma dos enócitos do corpo gorduroso de operárias de *A. mellifera*. RN (recém-nascidas), CR (com rainha), SR (sem rainha) aos 5, 10, 15 e 20 dias (D) de idade

4.4 Análise da expressão dos genes candidatos e miRNAs em abelhas

Os resultados obtidos pela amplificação dos genes alvo, por qPCR (Termociclador StepOne Plus, Applied Biosystems), foram analisados quanto aos níveis de expressão por $\Delta\Delta C_t$ comparativo. Para isso foi calculado a média dos valores de C_t entre as amostras. O valor numérico de C_t é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito, ou seja, quanto menor valor de C_t , maior é a expressão do gene de interesse (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Calculando-se a

diferença de Ct entre o gene de interesse e o gene controle (*rpl32* e *miR-252b*), foram obtidos os valores de ΔCt , usados nos testes estatísticos (*Two Way ANOVA*) com nível de significância $\leq 0,05$, e que para construção dos gráficos foram transformados em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (figuras 11 a 14).

Na primeira etapa, abelhas na presença de rainhas, pudemos observar que tanto em cérebro (Anexo I) quanto em corpo gorduroso há uma clara modulação na expressão destes genes estudados. Observamos também que, com exceção do *e74*, todos os genes estudados apresentam elevado nível de transcrição no corpo gorduroso das abelhas próximas à transição de alimentadora para forrageira, 15 e 20 dias. *E74* é um gene que codifica um fator de transcrição regulado por ecdisona e que apresenta maiores níveis de transcrição tanto em cérebro quanto corpo gorduroso de operárias recém-emergidas.

Avaliamos também como esses mesmos genes e miRNAs respondem à condição de orfandade, isto porque as operárias podem passar para status de poedeiras e ainda podem regredir ou avançar na transição nutriz-forrageira a fim de manter o funcionamento do ninho. Para tal estudo, realizamos novamente o perfil de expressão dos genes candidatos utilizando abelhas das mesmas idades que a primeira etapa (0, 5, 10, 15 e 20 dias) porém provenientes de um ninho sem a rainha, ou seja, operárias órfãs. Observamos que, diferentemente da condição normal, os genes não apresentaram, de forma geral, um padrão bem evidente dos níveis de transcrição. O que pudemos observar foi que, com exceção de *pi3k* e *e74*, os genes estudados se aproximaram de um padrão tendo um aumento entre 5 e 10 dias seguido de uma queda nos estágios finais, 15 e 20 dias. Interessantemente, esses níveis são opostos ao observado em condições normais, nos indicando assim que em condição de orfandade há uma alteração na expressão destes genes, o que pode ser uma

resposta à manutenção da alimentação proteica e ativação dos ovários, o que poderia influir no envelhecimento destas abelhas.

Na condição de orfandade, em ninhos em que nenhuma operária recém emergida é colocada, as operárias mais velhas continuam sintetizando as principais proteínas da geleia real e regridem ou se mantêm no *status* de nutridoras (OHASHI et al., 2000). UENO et al., 2015 sugerem que as sinalizações da ecdisona e hormônio juvenil são ativadas nas glândulas hipofaringeanas de forrageiras e que a sinalização pela ecdisona reprime a expressão de genes seletivos tanto em nutrízes quanto em forrageiras, enquanto o HJ suprarregula genes seletivos em forrageiras e subregula outros em nutrízes. Este quadro pode ser uma resposta às modificações do estado nutricional que está intimamente relacionado com a regulação do desenvolvimento comportamental através da via de IIS, que atua sobre síntese de HJ (NILSEN et al., 2011).

Figura 11. Perfil de transcrição dos miRNAs miR-8, miR-14 e miR-34 em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 12. Perfil de transcrição dos genes *pten* e *pi3k* em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 13. Perfil de transcrição dos genes DOR e *chico* em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; *** Nível de significância $\leq 0,0001$; **** Nível de significância $\leq 0,00001$

Figura 14. Perfil de transcrição do gene *e74* em corpo gorduroso durante o desenvolvimento de *Apis mellifera*. CR – Com rainha, SR – Sem rainha, 0,5,10,15,20 - dias de vida. * Diferença significativa: * Nível de significância $\leq 0,01$; ** Nível de significância $\leq 0,001$; * Nível de significância $\leq 0,0001$.**

A autofagia é fundamental para a renovação de tecidos e órgãos, pois ajudam a eliminar organelas supérfluas e danificadas seja na remodelação do tecido ou durante a homeostase tecidual (KOURTIS; TAVERNARAKIS, 2009). Em determinados tecidos, como o corpo gorduroso, ocorre altas taxas de autofagia durante o período pré-pupal, sendo assim um órgão interessante para estudo uma vez que a autofagia fornece nutrientes e energia essenciais para o desenvolvimento de tecidos na fase adulta (RUSTEN et al., 2004; SCOTT; SCHULDINER; NEUFELD, 2004). Sendo *DOR* um regulador da autofagia, torna-se interessante o estudo desse gene pois este é abundantemente expresso em tecidos sensíveis à insulina e como pode ser observado seus maiores níveis de transcrição em corpo gorduroso ocorre principalmente entre 15 e 20 dias em condições normais, quando importantes modificações relativas ao metabolismo e amadurecimento de tecidos e órgãos – corpo gorduroso e ovários - são verificadas nas operárias, especialmente na condição de orfandade.

As abelhas desenvolvem tarefas dentro e fora do ninho de acordo com a idade, mas essa ontogênese comportamental pode ser separada experimentalmente da idade em si. Em experimentos usando colônias *single cohort* as operárias são induzidas a se dividirem entre o trabalho de nutrízes e forrageiras (AMDAM; PAGE, 2005; NELSON et al., 2007; PAGE; AMDAM, 2007). Neste momento, há um aumento da expressão de *pten* que pode estar envolvido com as alterações do citoesqueleto nos corpos cogumelares, um centro regulador do comportamento e da memória. No corpo gorduroso, o gene da vitelogenina é expresso em altos níveis em nutrízes (GUIDUGLI et al., 2005; NELSON et al., 2007; PAGE et al., 2006). Vg é um precursor do vitelo e proteína efetora comportamental e sugere-se que pode suprimir a via de IIS e talvez Egfr

em abelhas (CORONA et al., 2007; PATEL et al., 2007). A via de sinalização da insulina é reduzida no corpo gorduroso de nutrízes (AMENT et al., 2008) e portanto os resultados obtidos para a maioria dos genes, inclusive *pten*, estão de acordo com o esperado, ou seja, respondeu a uma mudança ambiental e no metabolismo destas abelhas.

IRS, *insulin receptor substrate*, ou simplesmente *chico* é um gene central da IIS que pode atuar afetando o comportamento relacionado à nutrição possivelmente interagindo com Vg e HJ (WANG et al., 2010). No corpo gorduroso, *chico* é ativado pelo receptor de insulina (*InR*) que por sua vez é ativado pela ligação das *Insulin-like proteins* (ILPs). A ativação de *chico* dá início a uma cascata de transdução de sinal da fosfoquinase que envolve a *pi3k*, a PDK e a proteína quinase Akt (SARBASSOV; GUERTIN; ALI, 2005), veja Figura 1.

Podemos perceber então que todos esses genes estão correlacionados, como *chico* e *pi3k* que estão intimamente relacionados e *pten* atuando como antagonista de *pi3k*. Assim, relações entre IIS, variação de comportamento das operárias e vitelogenina são evidentes (WANG et al., 2010). Quando ocorre uma supressão de *chico* por RNAi em abelhas adultas, as operárias alteram o comportamento condicionado aos níveis de VG. Como já demonstrado na literatura, *vg* é diferencialmente expresso em linhagens de operárias coletoras de pólen e assim sugere-se que a vitelogenina afete o ciclo de vida e o envelhecimento ao interagir com a transdução de IIS (CORONA et al., 2007; HUNT et al., 2007; NELSON et al., 2007).

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado para os genes estudados pois observamos que, de forma geral, nas fases iniciais da vida das abelhas operárias há uma alta transcrição desses genes tanto em cérebro

quanto em corpo gorduroso, seguido de uma forte queda aos 5 dias e aumentando gradativamente no decorrer do envelhecimento ficando os níveis de transcrição bem elevados nas últimas idades estudadas, principalmente no corpo gorduroso dessas abelhas em condições normais. Isto se deve ao fato do corpo gorduroso ser um “centro metabólico”. Esse aumento gradativo também é observado para o HJ, ficando assim bem evidente a correlação dos genes estudados em todas estas vias.

5. Conclusão

Em nosso trabalho analisamos a expressão dos genes, mRNAs e miRNAs, de uma via específica, IIS, no corpo gorduroso (centro metabólico) de *Apis mellifera* a fim de verificar sua relação com o processo de transição comportamental e o envelhecimento em *A. mellifera* (AMENT et al., 2011; CORONA et al., 2007; GROZINGER et al., 2003; WHITFIELD; CZIKO; ROBINSON, 2003). Durante a transição nutriz-forrageira ocorre uma alteração da alimentação nas abelhas o que afeta seu metabolismo havendo, durante essa transição, um aumento gradual da expressão dos genes das vias IIS e TOR (AMENT; WANG; ROBINSON, 2010; AMENT et al., 2008). Observamos que estes genes e miRNAs estão diferencialmente expressos não só no corpo gorduroso, mas também no cérebro, apresentando respostas similares e/ou correlacionadas quanto ao evento de envelhecimento/amadurecimento das operárias.

Observamos também que os miRNAs possuem altos níveis de expressão no corpo gorduroso e estes, por regular genes importantes da via de insulina estariam envolvidos no processo do desenvolvimento adulto, ou envelhecimento, das abelhas. Vimos que em condição de orfandade os níveis de expressão

desses miRNAs sofrem uma queda na sua expressão quando comparados com os dados obtidos nos controles, condição normal. Em relação à análise da morfologia das células do corpo gorduroso, pudemos verificar que a condição de orfandade afeta as células do corpo gorduroso e ainda sugerimos uma alteração na distribuição e número de grânulos nos enócitos. Estes resultados abrem novas perspectivas para estudos sobre o desenvolvimento adulto, tendo os enócitos como modelo para análise dos sinais de envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, B. et al. MicroRNAs – Biogênese , funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontol. Clin.-Cient.**, v. 9, n. 2, p. 105–109, 2010.

AMDAM, G. V. et al. Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 31, p. 11350–11355, 3 ago. 2004.

AMDAM, G. V. Social context, stress, and plasticity of aging. **Aging Cell**, v. 10, n. 1, p. 18–27, fev. 2011.

AMDAM, G. V.; PAGE, R. E. Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect. **Ageing Research Reviews**, v. 4, n. 3, p. 398–408, ago. 2005.

AMENT, S. A. et al. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 22, p. 3808–3821, 15 nov. 2011.

AMENT, S. A.; WANG, Y.; ROBINSON, G. E. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: Toward a systems biology perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 5, p. 566–576, 2010.

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**, v. 105, n. 11, p. 4226–4231, 18 mar. 2008.

ASENCOT, M.; LENSKEY, Y. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. **Insect Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 127–133, 1988.

ASHBY, R. et al. MicroRNAs in Honey Bee Caste Determination. **Scientific Reports**, v. 6, p. 18794, 7 jan. 2016.

BARBIERI, M. et al. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans: Fig. 1. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 285, n. 5, p. E1064–E1071, 2003.

BARCHUK, A. R. et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 1, p. 70, 2007.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, jan. 2009.

BARZILAI, N. et al. The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1315–1322, 1 jun. 2012.

BASAVARAJU, M.; DE LENCASTRE, A. Alzheimer's disease: presence and role of microRNAs. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 4, p. 241–252, 1 jan. 2016.

BEETSMA, J. The Process of Queen-Worker Differentiation in the Honeybee. **Bee World**, v. 60, n. 1, p. 24–39, 1979.

BENITEZ, A. L. G. DE A. **Dietas Proteicas sobre a produção de geleia real e parâmetros associados em colmeias de *Apis mellifera***. [s.l.] Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, 2000.

- BERNARDO, T. J. et al. A view through a chromatin loop: Insights into the ecdysone activation of early genes in *Drosophila*. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 16, p. 10409–10424, 2014.
- BHAT, S. S.; JARMOLOWSKI, A.; SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA, Z. MicroRNA biogenesis: Epigenetic modifications as another layer of complexity in the microRNA expression regulation. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 4, p. 717–723, 22 nov. 2016.
- BIGAGLI, E. et al. DNA copy number alterations, gene expression changes and disease-free survival in patients with colorectal cancer: a 10 year follow-up. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 6, p. 545–558, 5 dez. 2016.
- BOLELI, I. C.; SIMÕES, Z. L. P.; HARTFELDER, K. The stomatogastric nervous system of the honey bee (*Apis mellifera*) in a critical phase of caste development. **Journal of Morphology**, v. 236, n. 2, p. 139–149, 1998.
- BOMTORIN, A. D. et al. Hox Gene Expression Leads to Differential Hind Leg Development between Honeybee Castes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40111, 25 jul. 2012.
- BORDIER, C. et al. Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism. **Journal of Insect Physiology**, v. 98, p. 47–54, abr. 2017.
- BOURKE, A. F. G. Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 12, n. 2, p. 245–257, mar. 1999.
- BRITTON, J. S. et al. *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. **Developmental Cell**, v. 2, n. 2, p. 239–249, 2002.
- BRUNET, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, n. 6, p. 857–868, 1999.
- CALABI, P.; PORTER, S. D. Worker longevity in the fire ant *Solenopsis invicta*: Ergonomic considerations of correlations between temperature, size and metabolic rates. **Journal of Insect Physiology**, v. 35, n. 8, p. 643–649, jan. 1989.
- CALDERARI, S. et al. Biological roles of microRNAs in the control of insulin secretion and action. **Physiological Genomics**, v. 49, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2017.
- CAMERON, R. C.; DUNCAN, E. J.; DEARDEN, P. K. Biased gene expression in early honeybee larval development. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 903, 2013.
- CANTLEY, L. C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655–1657, 31 maio 2002.
- CHAN, Q. W. T. et al. The Worker Honeybee Fat Body Proteome Is Extensively Remodeled Preceding a Major Life-History Transition. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24794, 28 set. 2011.
- CHAPUISAT, M.; KELLER, L. Division of labour influences the rate of ageing in weaver ant workers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1494, p. 909–913, 7 maio 2002.
- CHAWLA, G. et al. A let-7-to-miR-125 MicroRNA Switch Regulates Neuronal Integrity and Lifespan in *Drosophila*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, p. e1006247, 10 ago. 2016.
- CHEN, H. et al. MicroRNA-34a inhibits proliferation and stimulates apoptosis in human keratinocyte through activation of Smac-mediated mitochondrial apoptotic pathway: a

potential therapeutic target for psoriasis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 10, n. 1, p. 266–273, 1 jan. 2017.

CHRYSOHOOU, C.; STEFANADIS, C. Longevity and Diet. Myth or pragmatism? **Maturitas**, v. 76, n. 4, p. 303–307, dez. 2013.

CINNAMON, E. et al. Drosophila Spidey/Kar Regulates Oenocyte Growth via PI3-Kinase Signaling. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 8, p. e1006154, 8 ago. 2016.

CLANCY, D. J. Extension of Life-Span by Loss of CHICO, a Drosophila Insulin Receptor Substrate Protein. **Science**, v. 292, n. 5514, p. 104–106, 6 abr. 2001.

COLOMBANI, J. et al. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in Drosophila. **Science (New York, N.Y.)**, v. 310, n. 5748, p. 667–70, 28 out. 2005.

CORONA, M. et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 17, p. 7128–7133, 24 abr. 2007.

CORONA, M.; LIBBRECHT, R.; WHEELER, D. E. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in social insects. **Current Opinion in Insect Science**, v. 13, p. 55–60, fev. 2016.

COWLAND, J. B.; HOTHER, C.; GRØNBAEK, K. MicroRNAs and cancer. **APMIS**, v. 115, n. 10, p. 1090–1106, out. 2007.

CRUZ-LANDIM, C. Oenocytes of honey bee workers - Structural modifications during their adult life. **Rivista Di Biologia**, n. 78, p. 107–122, 1985.

CULLINEY, T. W. Origin and Evolutionary History of the Honeybees Apis. **Bee World**, v. 64, n. 1, p. 29–38, 31 jan. 1983.

DA CRUZ-LANDIM, C. O corpo gorduroso da larva de Melipona quadrifasciata anthidioides Lep.(Apidae, Meliponinae). **Naturalia**, v. 8, p. 7–23, 1983.

DALMAY, T. MicroRNAs and cancer. **Journal of Internal Medicine**, v. 263, n. 4, p. 366–375, abr. 2008.

DANKA MOHAMMED, C. P. et al. MicroRNAs in brain aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, p. 1–7, jan. 2017.

DANNEFER, D.; DAUB, A. Extending the interrogation: Life span, life course, and the constitution of human aging. **Advances in Life Course Research**, v. 14, n. 1–2, p. 15–27, mar. 2009.

DE AZEVEDO, S. V.; HARTFELDER, K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 54, n. 6, p. 1064–1071, 2008.

DEAN, E. L.; LOCKE, M.; COLLINS, J. V. Structure of fat body. In: **Comprehensive Insect Physiology**. [s.l.] Pergamon Press, 1985. p. 155–210.

DEMONTIS, F.; PERRIMON, N. FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 813–825, 2010.

DONG, X. C. et al. Inactivation of Hepatic Foxo1 by Insulin Signaling Is Required for Adaptive Nutrient Homeostasis and Endocrine Growth Regulation. **Cell Metabolism**, v.

8, n. 1, p. 65–76, jul. 2008.

FAROOQUI, T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 1, p. 122–136, jan. 2013.

FEDINA, T. Y. et al. Dietary Effects on Cuticular Hydrocarbons and Sexual Attractiveness in *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e49799, 5 dez. 2012.

FISCHER, E. K.; O'CONNELL, L. A. Modification of feeding circuits in the evolution of social behavior. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 1, p. 92–102, 1 jan. 2017.

FLATT, T.; SCHMIDT, P. S. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 951–962, out. 2009.

FOOTTIT, R. G.; ADLER, P. H. **Insect Biodiversity: Science and Society**. [s.l.] Blackwell Publishing Ltd, 2009.

FRANCIS, V. A.; ZORZANO, A.; TELEMAN, A. A. DDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. **Current Biology**, v. 20, n. 20, p. 1799–1808, 2010.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Apis)**. [s.l.] EDUSP, 1980.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810–821, jan. 2009.

GARG, D.; COHEN, S. M. miRNAs and aging: A genetic perspective. **Ageing Research Reviews**, v. 17, p. 3–8, set. 2014.

GAUHAR, Z. et al. Genomic mapping of binding regions for the Ecdysone receptor protein complex. **Genome Research**, v. 19, n. 6, p. 1006–1013, 1 jun. 2009.

GOBLIRSCH, M.; HUANG, Z. Y.; SPIVAK, M. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58165, 6 mar. 2013.

GRILLARI, J.; HACKL, M.; GRILLARI-VOGLAUER, R. miR-17-92 cluster: Ups and downs in cancer and aging. **Biogerontology**, v. 11, n. 4, p. 501–506, 2010.

GROZINGER, C. M. et al. Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. Supplement 2, p. 14519–14525, 25 nov. 2003.

GUIDUGLI, K. R. et al. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. **FEBS Letters**, v. 579, n. 22, p. 4961–4965, 12 set. 2005.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. **Current topics in developmental biology**, v. 40, p. 45–77, 1998.

HAUNERLAND, N. H.; SHIRK, P. D. REGIONAL AND FUNCTIONAL DIFFERENTIATION IN THE INSECT FAT BODY. **Annual Review of Entomology**, n. 40, p. 121–145, 1995.

HEEMST, D. VAN. Insulin, IGF-1 and longevity. **Aging and Disease**, v. 1, n. 2, p. 147–

57, 2010.

HERNDON, L. A. et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. **Nature**, v. 419, n. 6909, p. 808–814, 2002.

HORRIDGE, A. Generalization in visual recognition by the honeybee (*Apis mellifera*). A review and explanation. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 6, p. 499–511, 2009.

HSIEH, Y.-S.; HSU, C.-Y. Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 233–240, abr. 2011.

HUANG, H. et al. PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development. **Development**, v. 126, n. 23, p. 5365–5372, 1999.

HUANG, Z. Y.; ROBINSON, G. E. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 39, n. 3, p. 147–158, 1996.

HUNT, G. J. et al. Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 4, p. 247–267, 2007.

HUTVAGNER, G. A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2056–2060, 20 set. 2002.

HYUN, S. et al. Conserved MicroRNA miR-8/miR-200 and Its Target USH/FOG2 Control Growth by Regulating PI3K. **Cell**, v. 139, n. 6, p. 1096–1108, dez. 2009.

JEMIELITY, S. et al. Long live the queen: studying aging in social insects. **AGE**, v. 27, n. 3, p. 241–248, set. 2005.

JIN, H.; KIM, V. N.; HYUN, S. Conserved microRNA miR-8 controls body size in response to steroid signaling in *Drosophila*. **Genes & Development**, v. 26, n. 13, p. 1427–1432, 1 jul. 2012.

JONES, O. R. et al. Diversity of ageing across the tree of life. **Nature**, v. 505, n. 7482, p. 169–173, 8 dez. 2013.

JUNG-HOFFMANN, I. Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene. **Bienenforsch**, v. 8, p. 296–322, 1966.

JUNG, T.; HÖHN, A.; GRUNE, T. Lipofuscin: Detection and Quantification by Microscopic Techniques. In: **The Analyst**. [s.l.: s.n.]. v. 127p. 173–193.

KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, n. 7348, p. 478–483, 26 maio 2011.

KATO, M.; SLACK, F. J. Ageing and the small, non-coding RNA world. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 429–435, jan. 2013.

KEELEY, L. L. Physiology and biochemistry of the fat body. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Eds.). . **Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology**. New York: Pergamon Press, 1985. v. 1p. 83–111.

KELLER, L.; GENOUD, M. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 958–960, 30 out. 1997.

KELLER, L.; JEMIELITY, S. Social insects as a model to study the molecular basis of ageing. **Experimental Gerontology**, v. 41, n. 6, p. 553–556, jun. 2006.

- KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504–512, 2010.
- KLEIN, A. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 7 fev. 2007.
- KORB, J. Why do social insect queens live so long? Approaches to unravel the sociality-aging puzzle. **Current Opinion in Insect Science**, v. 16, p. 104–107, ago. 2016.
- KOURTIS, N.; TAVERNARAKIS, N. Autophagy and cell death in model organisms. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 21–30, 22 jan. 2009.
- KRAMER, B. H.; SCHAIBLE, R. Colony size explains the lifespan differences between queens and workers in eusocial Hymenoptera. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 109, n. 3, p. 710–724, jul. 2013.
- KSIAZKIEWICZ KAPRALSKA, M. Ultrastructure of the imaginal oenocytes in aspidiotus hederæ homoptera coccioidea. **Acta Biologica Cracoviensia Series Zoologia**, n. 26, p. 1–6, 1 jan. 1984.
- KUSSMANN, M.; STOVER, P. J. **Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease**. 2. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017.
- LATTORFF, H. M. G.; MORITZ, R. F. A. Genetic underpinnings of division of labor in the honeybee (*Apis mellifera*). **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 641–648, nov. 2013.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, dez. 1993.
- LEIMAR, O. et al. Development and evolution of caste dimorphism in honeybees - a modeling approach. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 12, p. 3098–3109, dez. 2012.
- LEONCINI, I. et al. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 50, p. 17559–17564, 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LOCKE, M. The ultrastructure of the oenocytes in the molting cycle of an insect. **Tissue and Cell**, v. 1, n. 1, p. 103–154, jan. 1969.
- LOCKE, M. The Structure and Development of the Vacuolar System in the Fat Body of Insects. In: **Insect Ultrastructure**. Boston, MA: Springer US, 1984. p. 151–197.
- LOCKE, M.; COLLINS, J. V. PROTEIN UPTAKE INTO MULTIVESICULAR BODIES AND STORAGE GRANULES IN THE FAT BODY OF AN INSECT. **The Journal of Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 453–483, 1 mar. 1968.
- LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, jun. 2013.
- LU, K. et al. TOR Pathway-Mediated Juvenile Hormone Synthesis Regulates Nutrient-Dependent Female Reproduction in *Nilaparvata lugens* (Stål). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 438, 28 mar. 2016.

LUCHT-BERTRAM, E. Das postembryonale wachstum von hirnteilen bei *Apis mellifica* L. und *Myrmeleon europaeus* L. **Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere**, v. 50, n. 5, p. 543–575, 1961.

LYNN, F. C. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 9, p. 452–459, nov. 2009.

MACFARLANE, L.-A.; R. MURPHY, P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Current Genomics**, v. 11, n. 7, p. 537–561, 1 nov. 2010.

MAESTRO, J. L.; COBO, J.; BELLES, X. Target of Rapamycin (TOR) Mediates the Transduction of Nutritional Signals into Juvenile Hormone Production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5506–5513, 27 fev. 2009.

MAKKI, R.; CINNAMON, E.; GOULD, A. P. The Development and Functions of Oenocytes. **Annual Review of Entomology**, v. 59, n. 1, p. 405–425, 7 jan. 2014.

MARX, R. Changes in the fat body ultrastructure during the fifth larval instar in workers, queen and drones of the honey bee, *Apis mellifera*. **CHEMISTRY AND BIOLOGY OF SOCIAL INSECTS INTERNATIONAL CONGRESS OF IUSSI**, v. 10, p. 86–87, 1987.

MCELWEE, J. J. et al. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. **Genome Biology**, v. 8, n. 7, p. R132, 2007.

MEDVED, V.; HUANG, Z. Y.; POPADIC, A. Ubx promotes corbicular development in *Apis mellifera*. **Biology Letters**, v. 10, n. 1, p. 20131021–20131021, 29 jan. 2014.

MELLO, T. R. P. et al. Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). **Frontiers in genetics**, v. 5, n. DEC, p. 445, 22 dez. 2014.

MELTZER, P. S. Cancer genomics: Small RNAs with big impacts. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 745–746, 9 jun. 2005.

MENGONI GOÑALONS, C. et al. Insulin effects on honeybee appetitive behaviour. **The Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 19, p. 3003–3008, 1 out. 2016.

MENZEL, R. Learning in honey bees in an ecological and behavioral context. In: **Fortschritte der Zoologie, Band 31**. [s.l.] Experimental behavioral ecology and sociobiology, 1985. p. 55–74.

MENZEL, R.; GREGGERS, U.; HAMMER, M. Functional Organization of Appetitive Learning and Memory in a Generalist Pollinator, the Honey Bee. In: **Insect Learning**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 79–125.

MICHENER, C. D. Comparative Social Behavior of Bees. **Annual Review of Entomology**, v. 14, n. 1, p. 299–342, jan. 1969.

MICHENER, C. D. **The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study**. [s.l.] Belknap Press of Harvard University Press, 1974.

MIRTH, C. K. et al. Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 19, p. 7018–23, 2014.

MODA, L. M. et al. Nutritionally Driven Differential Gene Expression Leads to Heterochronic Brain Development in Honeybee Castes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64815, 30 maio 2013.

MORLEY, J. E. Diabetes and Aging: Epidemiologic Overview. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 24, n. 3, p. 395–405, ago. 2008.

NACHTSHEIM, H. Zytologische Studien über die Geschlechtsbestimmung bei der Honigbiene. **Arch. Zellforsch**, v. 11, p. 169–241, 1916.

NAUG, D. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. **Biological Conservation**, v. 142, n. 10, p. 2369–2372, out. 2009.

NELSON, C. M. et al. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, p. 0673–0677, 2007.

NIJHOUT, H. F.; WHEELER, D. E. Juvenile Hormone and the Physiological Basis of Insect Polymorphisms. v. 57, n. 2, p. 109–133, 1982.

NILSEN, K.-A. et al. Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 9, p. 1488–1497, 1 maio 2011.

OGG, S.; RUVKUN, G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. **Molecular Cell**, v. 2, n. 6, p. 887–893, 1998.

OHASHI, K. et al. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony. **Zoological Science**, v. 17, n. 8, p. 1089–1094, 2000.

OLDHAM, S. et al. The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdInsP(3) levels. **Development (Cambridge, England)**, v. 129, p. 4103–4109, 2002.

OLIVEIRA, V. T. P. DE; CRUZ-LANDIM, C. Morphology and Function of Insect Fat Body Cells : **Biociências**, v. 11, n. 2, p. 195–205, 2003.

PAGE, R. E. et al. The Development and Evolution of Division of Labor and Foraging Specialization in a Social Insect (*Apis mellifera* L.). **Current Topics in Developmental Biology**, v. 74, n. 06, p. 253–286, 2006.

PAGE, R. E.; AMDAM, G. V. The making of a social insect: Developmental architectures of social design. **BioEssays**, v. 29, n. 4, p. 334–343, 2007.

PAGE, R. E.; PENG, C. Y.-S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 4–6, p. 695–711, abr. 2001.

PANKIW, T. Worker honey bee pheromone regulation of foraging ontogeny. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 4, p. 178–181, 2004.

PATEL, A. et al. The Making of a Queen: TOR Pathway Is a Key Player in Diphenic Caste Development. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e509, 6 jun. 2007.

PEREGRIN, T. The new frontier of nutrition science: Nutrigenomics. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 11, p. 1306, 2001.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509–515, mar. 2004.

PIERRE, J.-P. **Apicultura : conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena**. 2. ed. México: Ediciones Mundi-Prensa, 1981.

- PIPER, M. D. W. et al. Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? **Journal of Internal Medicine**, v. 263, n. 2, p. 179–191, 21 jan. 2008.
- RACHINSKY, A. et al. Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. **General and Comparative Endocrinology**, v. 79, n. 1, p. 31–38, 1990.
- RACHINSKY, A.; ENGELS, W. Caste development in honeybees (*Apis mellifera*): Juvenile hormone turns on ecdysteroids. **Naturwissenschaften**, v. 82, n. 8, p. 378–379, 1995.
- RACHINSKY, A.; HARTFELDER, K. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 3, p. 189–194, 1990.
- REMBOLD, H.; LACKNER, B.; GEISTBECK, I. The chemical basis of honeybee, *Apis mellifera*, caste formation. Partial purification of queen bee determinant from royal jelly. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, n. 2, p. 307–314, 1974.
- ROBERTS, M.; MUTCH, D. M.; GERMAN, J. B. Genomics : food and nutrition. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 516–522, 2001.
- ROBINSON, G. E. Genomics and Integrative Analyses of Division of Labor in Honeybee Colonies. **The American Naturalist**, v. 160, n. S6, p. S160–S172, dez. 2002.
- ROBINSON, G. E.; HUANG, Z.-Y. Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. **Apidologie**, v. 29, n. 1–2, p. 159–170, 1998.
- ROMER, F.; EMMERICH, H.; NOWOCK, J. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, n. 10, p. 1975–1987, out. 1974.
- RONAI, I. et al. The dynamic association between ovariole loss and sterility in adult honeybee workers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1851, p. 20162693, 2017.
- ROTTIERS, V.; NÄÄR, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 239–250, 1 abr. 2012.
- ROZHOK, A. I.; SALSTROM, J. L.; DEGREGORI, J. Stochastic modeling indicates that aging and somatic evolution in the hematopoietic system are driven by non-cell-autonomous processes. **Aging**, v. 6, n. 12, p. 1033–1048, 17 dez. 2014.
- RUEPPELL, O. et al. Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 10, p. 1020–1032, out. 2007.
- RUEPPELL, O. et al. Early life stress affects mortality rate more than social behavior, gene expression or oxidative damage in honey bee workers. **Experimental Gerontology**, v. 90, p. 19–25, abr. 2017.
- RUEPPELL, O.; AUMER, D.; MORITZ, R. F. Ties between ageing plasticity and reproductive physiology in honey bees (*Apis mellifera*) reveal a positive relation between fecundity and longevity as consequence of advanced social evolution. **Current Opinion in Insect Science**, v. 16, p. 64–68, ago. 2016.
- RUEPPELL, O.; KAFTANOUGLU, O.; PAGE JR., R. E. Honey bee (*Apis mellifera*) workers live longer in small than in large colonies. **Experimental Gerontology**, v. 44, n.

6–7, p. 447–452, jun. 2009.

RUSSELL, S. J.; KAHN, C. R. Endocrine regulation of ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 681–691, 1 set. 2007.

RUSTEN, T. E. et al. Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K Pathway. **Developmental Cell**, v. 7, n. 2, p. 179–192, 2004.

RUTZ, W. et al. The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 22, n. 11, p. 1485–1491, jan. 1976.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. v. 307, n. February, p. 1098–1102, 2005.

SCHMITTGEN, T. D. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 5b, p. 1811–1819, out. 2008.

SCHULZ, D. J.; HUANG, Z.-Y.; ROBINSON, G. E. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 42, n. 5, p. 295–303, 8 maio 1998.

SCHULZ, R. A Life Span Model of Successful Aging. **American Psychological Association**, v. 51, n. 7, p. 702–714, 1996.

SCOTT, R. C.; SCHULDINER, O.; NEUFELD, T. P. Role and Regulation of Starvation-Induced Autophagy in the *Drosophila* Fat Body. **Developmental Cell**, v. 7, n. 2, p. 167–178, ago. 2004.

SEEHUUS, S.-C. et al. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 4, p. 962–967, 24 jan. 2006.

SEEHUUS, S.-C. et al. Somatic Maintenance Resources in the Honeybee Worker Fat Body Are Distributed to Withstand the Most Life-Threatening Challenges at Each Life Stage. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e69870, 5 ago. 2013.

SEELEY, T. D. **The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies**. [s.l.] HARVARD UNIVERSITY PRESS, 1995.

SHI, Y.-Y. et al. Differentially expressed microRNAs between queen and worker larvae of the honey bee (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 46, n. 1, p. 35–45, 29 jan. 2015.

SINGH, S. K. et al. MicroRNAs - micro in size but macro in function. **FEBS Journal**, v. 275, n. 20, p. 4929–4944, out. 2008.

SNODGRASS, R. E. **Principles of Insect Morphology**. 1. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1935.

SRINIVASAN, M. V. Honeybees as a Model for the Study of Visually Guided Flight, Navigation, and Biologically Inspired Robotics. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 413–460, 1 abr. 2011.

ST-ONGE, M.-P.; GALLAGHER, D. Body composition changes with aging: The cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation? **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 152–155, fev. 2010.

- STOCKSTAD, E. The Case of The Empty Hives. **Science Mag**, v. 316, n. May, p. 970–972, 2007.
- STROUSTRUP, N. et al. The temporal scaling of *Caenorhabditis elegans* ageing. **Nature**, v. 530, n. 7588, p. 103–107, 2016.
- SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 5, p. 725–737, nov. 2008.
- TAIT, I. S.; LI, Y.; LU, J. Effects of PTEN on the longevity of cultured human umbilical vein endothelial cells: The role of antioxidants. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 1, p. 277–284, jan. 2015.
- TEIXEIRA, A. DAS D. **Análise proteômica da glândula de Dufour em operárias nutridoras e camperas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- THE HONEYBEE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. **Nature**, v. 443, n. 7114, p. 931–949, 26 out. 2006.
- TOFILSKI, A. Influence of caste polyethism on longevity of workers in social insect colonies. **Journal of Theoretical Biology**, v. 238, n. 3, p. 527–531, fev. 2006.
- TOTH, A. L. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 24, p. 4641–4649, 15 dez. 2005.
- TOWER, J. et al. Variegated Expression of Hsp22 Transgenic Reporters Indicates Cell-specific Patterns of Aging in *Drosophila* Oenocytes. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 69A, n. 3, p. 253–259, mar. 2014.
- TRAPP, J.; MCAFEE, A.; FOSTER, L. J. Genomics, transcriptomics and proteomics: enabling insights into social evolution and disease challenges for managed and wild bees. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 3, p. 718–739, fev. 2017.
- TSAKIRI, E. N. et al. Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1155–1163, dez. 2013.
- TURILLAZZI, S.; WEST-EBERHARD, M. J. **Natural History and Evolution of Paper-Wasps**. [s.l.] OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1996.
- UENO, T. et al. Changes in the gene expression profiles of the hypopharyngeal gland of worker honeybees in association with worker behavior and hormonal factors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–20, 2015.
- VAN DER HORST, A.; BURGERING, B. M. T. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 440–450, jun. 2007.
- VARGHESE, J.; COHEN, S. M. microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. **Genes & Development**, v. 21, n. 18, p. 2277–2282, 15 set. 2007.
- VARGHESE, J.; LIM, S. F.; COHEN, S. M. *Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe. **Genes & Development**, v. 24, n. 24, p. 2748–2753, 15 dez. 2010.

- WANG, Y. et al. Down-regulation of honey bee IRS gene biases behavior toward food rich in protein. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 4, p. 24–26, 2010.
- WANG, Y. et al. Insulin-like peptides (AmlLP1 and AmlLP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 23, p. 4347–4357, 1 dez. 2013.
- WEBB, A. E.; KUNDAJE, A.; BRUNET, A. Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. **Aging Cell**, v. 15, n. 4, p. 673–685, 2016.
- WHEELER, D. E. . Developmental and Physiological Determinants of Caste in Social Hymenoptera. **The American Naturalist**, v. 128, n. 1, p. 13–34, 1986.
- WHEELER, D. E.; BUCK, N.; EVANS, J. D. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 5, p. 597–602, 2006.
- WHITFIELD, C. W.; CZIKO, A.-M.; ROBINSON, G. E. Gene Expression Profiles in the Brain Predict Behavior in Individual. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 296–299, 2003.
- WIGGLESWORTH, V. B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 19, p. 56–77, 1942.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–862, dez. 1993.
- WILSON, E. O. The Insect Societies. **Belknap Press of Harvard University Press**, p. 548, 1971.
- WILSON, E. O. One Giant Leap: How Insects Achieved Altruism and Colonial Life. **BioScience**, v. 58, n. 1, p. 17–25, 2008.
- WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. [s.l.] Harvard University Press, 1987.
- WOYCIECHOWSKI, M.; MORÓN, D. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, v. 56, n. 2, p. 193–201, 3 jul. 2009.
- ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9779–9784, 19 ago. 2003.
- ZHANG, W.; DAHLBERG, J. E.; TAM, W. MicroRNAs in Tumorigenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 3, p. 728–738, set. 2007.

ANEXO I

Gráfico referente aos resultados dos perfis de transcrição dos genes, sendo comparada a expressão em cérebro e corpo gorduroso. Optamos por não incluir tais dados pois seguimos as análises apenas com amostras de corpo gorduroso.