**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Efeitos nutricionais sobre a progressão do desenvolvimento adulto de operárias *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

FELIPE MARIELLI SOARES DA SILVA

**RIBEIRÃO PRETO, SP
- 2015 -**

FELIPE MARIELLI SOARES DA SILVA

Efeitos nutricionais sobre a progressão do desenvolvimento adulto de operárias *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: GENÉTICA

Orientador: Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes

RIBEIRÃO PRETO, SP
- 2015 -

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.

Silva, Felipe Martelli Soares

Efeitos nutricionais sobre a progressão do desenvolvimento adulto de
operárias *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) – Ribeirão Preto, 2015. 93p.: il.
30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Nunes, Francis de Moraes Franco

1. Nutrição. 2. Transcriptoma. 3. Estresse Oxidativo. 4. Hidrocarbonetos

Apoio financeiro:

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Programa de Pós-graduação em Genética FMRP-USP, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2011/03171-5.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Felipe Martelli Soares da Silva

Título da Dissertação: Efeitos nutricionais sobre a progressão do desenvolvimento adulto de operárias *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

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 do 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 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes por me oferecer a oportunidade de desenvolver um trabalho empolgante, por todas as discussões nos mais variados campos do conhecimento humano e por toda a experiência e amizade compartilhada.

Ao Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares, coordenador do Programa de Pós-graduação em Genética durante a maior parte do tempo em que esse trabalho foi realizado, por todo o suporte e investimento fornecidos e pela enorme educação e humildade com que sempre trata a todos. Bem como ao suporte da atual coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética, em nome da Profa. Dra. Silvana Giuliatti e das Secretarias Susie Adriana Penha Nalon e Silvia Consiglieri.

Às Profas. Dras. Márcia Maria Gentile Bitondi e Zilá Luz Paulino Simões por me acolherem em seu laboratório com tanto carinho e por todos os recursos físicos e suporte científico oferecidos, sem os quais não seria possível desenvolver este trabalho.

À técnica Dra. Vera Lúcia Castelo Figueiredo pela forma meticulosa com a qual gerencia e organiza todo o laboratório, pela grande experiência compartilhada durante o manejo das abelhas e pelos momentos de descontração e amizade.

Ao Prof. Dr. David De Jong e à Dra. Kate Ihle por toda a gentileza na revisão dos textos em inglês produzidos ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento e ao Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais, do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP, por disponibilizarem o sistema de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas Shimadzu para a análise dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares.

Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder e à Dra. Karina Rosa Guidugli Lazzarini pelo vasto conhecimento a cerca da biologia de abelhas que resultaram em contribuições importantes ao longo do trabalho.

Aos apicultores Luiz Roberto Aguiar, Jairo de Souza e Dr. Rogério Aparecido Pereira pelo manejo das abelhas, peça fundamental deste trabalho. E aos integrantes do APILAB pelo suporte técnico durante a fase experimental, em especial à Aline Turcatto e à Claudinéia Costa.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck e à Dra. Camila Carrião por me receberem gentilmente no ICB-USP e por todo suporte e discussões que muito enriqueceram os experimentos de estresse oxidativo.

Ao Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro por todo o suporte na análise dos transcriptoma das bibliotecas de corpo gorduroso.

Ao analista de sistemas Dr. Pedro Roberto Prado pelo suporte computacional e radiante bom humor.

À técnica Marcela Laure pelo apoio na dissecação das glândulas hipofaríngeas.

Às funcionárias Cleusa e Shirley por manterem a ordem e a limpeza de todas as dependências do laboratório.

Aos amigos de laboratório, alguns dos quais não mais presentes por terem merecidamente se tornado Professores: Profa. Dra. Érica Tanaka, Prof. Dr. Rodrigo Dallaqua, Profa. Dra. Livia Moda e aos ainda colegas e futuros Professores: Dra. Camilla, Dra. Flávia, Fabiano, Tiago, Dra. Juliana, Dra. Liliane, Dra. Ana Durvalina, Dra. Michelle, Natália e Aline. Agradeço por terem tornado esses dois anos divertidíssimos e enriquecedores e por terem ajudado diariamente na realização desse trabalho. Em especial à Dra. Camilla Valente, que pelo azar de ocupar espaço na mesa ao lado tornou-se alvo constante de perguntas, pedidos e distrações; à Dra. Flávia Freitas pelo suporte na preparação das redes de interação proteicas; ao Tiago Falcón, sem o qual esse trabalho não possuiria o ensaio de hidrocarbonetos cuticulares; e à Natália Hernandez, por me acompanhar diariamente nos meus experimentos, muitas vezes pondo os dela de lado e por me introduzir ao maravilhoso mundo das abelhas. Reforço ainda meu agradecimento à Natália Hernandez e à Dra. Camilla Valente, assim como à Dra. Flávia Freitas que gentilmente fizeram a leitura da dissertação e contribuíram enormemente com a redação desse trabalho.

Aos meus pais, Marcelo e Valquíria, pelo apoio incondicional, a maior parte do tempo sem nem saber o que apoiavam, mas por persistirem ao meu lado sem esmorecer e por me darem todo o suporte que lhes era possível e um pouco mais. À minha família toda pela presença constante e incentivo vibrante. Em especial à Natália, mas do que pelo suporte científico diário, mas pelo inestimável suporte psicológico, pelo companheirismo e pela torcida incessante.

*A ciência básica para grandes descobertas
precisa ocorrer em um nível
em que não se pergunte “Qual o ganho econômico?”
Você pergunta:
“O que não se sabe? Onde podemos progredir?”*

David Kaplan,
físico teórico ligado ao projeto que levou 20 anos
para provar a existência do bóson de Higgs...
E revolucionar nossa compreensão do universo.

Nutrição, regulação da expressão gênica e estresse oxidativo são características corresponsáveis pelo desenvolvimento e tempo de vida. Muitos animais apresentam uma relação clara entre o aumento da longevidade e a diminuição da reprodução quando submetidos a restrições alimentares. Contudo, a relação nutrição-longevidade não está completamente elucidada em organismos prioritariamente inférteis e cuja alimentação varia durante a vida adulta, tais como abelhas operárias da espécie *A. mellifera*. Para explorar tais questões, operárias recém-emergidas foram confinadas em gaiolas e alimentadas com uma dieta isenta de proteína (DNP), ou uma dieta rica em proteínas (DP) por sete dias. Investigamos a influência das dietas sobre: a morfologia das glândulas hipofaringeanas, o transcriptoma do corpo gorduroso, o acúmulo de dano oxidativo, a composição de hidrocarbonetos cuticulares (CHC) e a sobrevivência. Operárias do grupo DNP apresentaram menor sobrevivência e menor grau de ativação das glândulas hipofaringeanas do que operárias do grupo DP. A anotação funcional do transcriptoma de operárias do grupo DNP revelou ainda a ativação da resposta a estímulos, diferenciação, migração e desenvolvimento celular e de projeções neuronais. Todas essas são características compatíveis ao que se observa em operárias naturalmente mais velhas, como é o caso das forrageiras. A anotação funcional do transcriptoma de operárias do grupo DP revelou a ativação do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos e regulação do sistema imunológico, características ligadas a operárias naturalmente jovens, como as nutridoras. Um total de 436 genes codificadores de proteínas foi apontado pelo sequenciamento em larga escala como dieta-responsivos (*fold change* > 2). O sequenciamento de RNAs curtos revelou três miRNAs dieta-responsivos (*fold change* > 2), miR-31a, miR-100 e miR-125, todos superexpressos no grupo DNP. Dentre esses 439 genes codificadores (mRNAs) e não codificadores de proteínas (miRNAs), dez foram experimentalmente validados em corpos gordurosos por RT-qPCR e quatro dos dez revelaram um perfil de expressão semelhante em cérebros frente às dietas. Juntos, nossos achados sustentam a existência de um circuito biológico integrado entre cabeça e corpo gorduroso capaz de regular os diferentes aspectos do controle da longevidade e do comportamento social. O ensaio de estresse oxidativo revelou não haver diferença entre o acúmulo de danos em cabeças nos dois grupos alimentares, talvez sinalizando a existência de uma resistência ou defesa antioxidante mais acentuada no sistema nervoso, protegendo-o. Por outro lado, observamos um nível maior de estresse oxidativo em corpos gordurosos de operárias do grupo DNP, sugerindo um déficit da resposta antioxidante, característica atrelada ao envelhecimento. Referente aos perfis de CHC, esses são similares entre operárias do grupo DP e operárias jovens (maior proporção de n-alcenos), bem como entre operárias do grupo DNP e operárias velhas (maior proporção de alcenos). Em conjunto, nossos resultados indicaram que uma dieta livre de proteínas antecipa o envelhecimento e sugerimos alguns novos marcadores do *status* nutricional e da progressão do desenvolvimento adulto em operárias: XP_624408.2, XP_393528.3 e XP_006561863.1, os órtólogos de CG9986, CG6058, CG2852, CG32031, CG5848 e CG9331, CG11138, CG10160, CG2674, CG5178, CG15884 e CG1322, além dos três microRNAs já citados. As alterações relacionadas ao *status* nutricional e envelhecimento, observadas nesse trabalho, suportam o uso de *A. mellifera* como um excelente organismo modelo no campo da nutrigenômica, bem como contribuem para o entendimento das modulações promovidas pela dieta no desenvolvimento adulto desse organismo.

Palavras-chave: Nutrição, Transcriptoma, Estresse Oxidativo, Hidrocarbonetos Cuticulares, Envelhecimento, Operárias *Apis mellifera* adultas.

Nutrition, oxidative stress and gene expression regulation are features responsible for development and lifespan. Many animals have a well-established relationship between an increase in longevity and a decrease in reproduction when subjected to dietary restrictions. However, the biological circuit nutrition-longevity is not fully elucidated in organisms primarily infertile and whose food consumption varies during adulthood, such as honey bee workers *A. mellifera*. To explore such questions, newly-emerged *A. mellifera* workers were confined in cages and fed a high protein diet (DP) or a protein-free diet (DNP) for seven days. We analyzed the morphology of hypopharyngeal glands, mRNAs and miRNAs global expression, oxidative damage, cuticular hydrocarbons profiles (CHC), and workers survival. Workers from DNP group had lower survival and lower activation of hypopharyngeal glands than workers from DP group. The functional annotation of DNP group transcriptome revealed activation of response to stimuli, cell differentiation, cell migration, cell growth and development of neuronal projections. All these biological processes are consistent with naturally older workers, such the foragers. The functional annotation of DP group transcriptome revealed activation of protein, lipid and carbohydrate metabolism and regulation of the immune system, features linked to younger workers, such nurses. Large-scale sequencing revealed that 436 protein-coding genes are diet-responsive (fold change > 2). Small RNAs sequencing revealed that three miRNAs are diet-responsive (fold change > 2), miR-31a, miR-100 and miR-125, all of them overexpressed in DNP group. Among these 439 coding (mRNA) and non-coding (miRNA) genes, 10 were validated in fatty bodies by RT-qPCR, and four of them showed a similar expression profile in brains in response to diets. Altogether, our results support the existence of an integrated biological circuit between head and fat body, which regulates different aspects of lifespan control and social behavior. Oxidative stress assay showed no difference between damage accumulation in honeybees' heads from DP and DNP groups; maybe supporting the existence of a sharp resistance or antioxidant defense in the nervous system, protecting it. On the other hand, we observed a greater accumulation of oxidative stress markers in fat bodies of DNP, suggesting a deficit of antioxidant response, an aging feature. The CHC profiles are similar between DP group workers and young workers (high proportion of n-alkanes), and also similar between DNP group workers and old workers (high proportion of alkenes). Taken together, our results suggest that protein-free diet anticipates aging process and provides new markers of nutritional status and progression of workers adult development: XP_624408.2, XP_393528.3, XP_006561863.1, the orthologs of CG9986, CG6058, CG2852, CG32031, CG5848 e CG9331, CG11138, CG10160, CG2674, CG5178, CG15884 and CG1322, besides the three microRNAs already mentioned. The genetic changes related to nutritional status and aging observed in this work support the use of *A. mellifera* as an excellent model organism in the field of nutrigenomics and also contribute to the understanding of modulations promoted by diet on the adult development of this organism.

Key-words: Nourishment, Transcriptome, Oxidative Stress, Cuticular Hydrocarbons, Aging, Adults *Apis mellifera* workers.

Figura 1 – Acondicionamento das abelhas.....	11
Figura 2 - Preparo das amostras de operárias para contagem dos esporos de <i>Nosema</i> sp.....	13
Figura 3 - Grau de ativação das glândulas hipofaríngeas.....	14
Figura 4 – Curva de sobrevivência em função da dieta.....	30
Figura 5 – Registro fotográfico das abelhas após 20 dias consumindo as dietas.....	31
Figura 6 – Média de expressão das bibliotecas de mRNA sequenciadas.....	32
Figura 7 – Dendrograma do agrupamento das bibliotecas sequenciadas.....	33
Figura 8 – Diagrama de Venn ressaltando genes diferencialmente expressos.....	33
Figura 9. Expressão gênica em corpo gorduroso por RT-qPCR - Validação experimental do sequenciamento em larga escala.....	35
Figura 10 – Expressão gênica em cabeça por RT-qPCR dos genes validados em corpo gorduroso.....	37
Figura 11 – Rede de interação proteína-proteína para o grupo DNP.....	41
Figura 12 – Rede de interação proteína-proteína para o grupo DP.....	42
Figura 13 – Concentração de marcadores de estresse oxidativo em corpos gordurosos.....	45
Figura 14 - Concentração de marcadores de estresse oxidativo em cabeças.....	47
Figura 15 – Análise de coordenadas principais dos perfis de CHC.....	48
Figura 16 – Proporção das classes de CHC em função das dietas.....	49
Figura 17 – Concentração dos CHC identificados como diferencialmente expressos entre as dietas.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Desenho experimental.....	12
Tabela II – Genes codificadores analisados por RT-qPCR.....	22
Tabela III – Oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão gênica por RT-qPCR.....	23
Tabela IV – Contagem de esporos de <i>Nosema</i> sp.....	29
Tabela V - Grau de ativação das glândulas hipofaríngeas.....	31
Tabela VI - Genes selecionados para validação experimental do sequenciamento de próxima geração do corpo gorduroso por RT-qPCR.....	35
Tabela VII – Termos enriquecidos na análise funcional dos genes diferencialmente expressos.....	39
Tabela VIII - <i>hubs</i> das redes de interações proteína-proteína (PPI) para as condições DP ou DNP.....	43
Tabela IX - Resultados de acúmulo de marcadores de dano oxidativo.....	44

1. Introdução.....	1
1.1. A relação nutrição-longevidade	1
1.2. Um modelo de estudo emergente para pesquisas em nutrigenômica	4
1.3. Justificativa	7
1.4. Hipótese	8
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Material e Métodos	10
3.1. Coleta das abelhas recém-emergidas e desenho experimental	10
3.2. Quantificação de esporos de <i>Nosema</i> sp.....	12
3.3. Curva de sobrevivência.....	13
3.4. Avaliação do grau de ativação de glândulas hipofaríngeas.	13
3.5. Análise da expressão gênica	14
3.5.1. Extração de RNA total.....	14
3.5.2 Construção e análise de bibliotecas de RNA longos (poliA+) e de pequenos RNAs de corpos gordurosos	15
3.5.3. RT-qPCR de genes selecionados em amostras de corpos gordurosos e cabeças	20
3.6. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos no sequenciamento em larga escala	24
3.7. Elaboração das redes de interação proteína – proteína	25
3.8. Avaliação do acúmulo de marcadores de dano oxidativo.....	25
3.9. Avaliação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares.....	26
4. Resultados	29
4.1. Quantificação dos esporos de <i>Nosema</i> sp	29
4.2. Análise de sobrevivência	29
4.3. Análise do grau de ativação das glândulas hipofaríngeas.....	31
4.4. Análise da expressão gênica em larga escala.....	32
4.4.1. Caracterização das Bibliotecas de RNAs longos.....	32
4.4.2. Caracterização das bibliotecas de miRNAs	33
4.5. Análise da expressão gênica pontual.	34
4.5.1. Validação do sequenciamento em larga escala por RT-qPCR	34
4.5.2 Análise da expressão gênica em cabeças por RT-qPCR.....	36

4.6. Anotação funcional dos genes codificadores de proteínas diferencialmente expressos	39
4.7. Análise das redes de interação proteína – proteína	40
4.8. Avaliação do acúmulo de estresse oxidativo	43
4.9. Avaliação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares	47
5. Discussão	51
5.1. Dieta sem proteínas reduz a longevidade de operárias	51
5.2. Dieta sem proteínas mantém inativas as glândulas hipofaríngeas de operárias de sete dias	52
5.3. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos e validação do sequenciamento em larga escala	53
5.4. Análise da expressão gênica pontual em cabeças fornece indícios da existência do circuito cérebro e o corpo gorduroso	58
5.5. A perturbação do transcriptoma do corpo gorduroso pela dieta sem proteínas se reflete nas previsões das redes de interação proteína-proteína	61
5.6. Operárias alimentadas com uma dieta livre de proteína (DNP) apresentam maior acúmulo de dano oxidativo aos sete dias de vida adulta.....	62
5.7. Dieta livre de proteínas perturba o perfil de CHC	64
5.8. Considerações finais	65
6. Conclusões	68
7. Referências bibliográficas	69
ANEXOS.....	CD

1.1. A relação nutrição-longevidade

Longevidade e envelhecimento são dois tópicos distintos de uma mesma temática. Enquanto a longevidade é definida como o tempo de duração da vida, desde o nascimento até a morte (Schulz & Heckhausen, 1996), o envelhecimento é entendido como o processo de deterioração das funções metabólicas de um organismo (Flatt & Schmidt, 2009). Logo, o envelhecimento pode se iniciar precocemente ou tardiamente ao longo da vida, influenciando na longevidade (Dannefer & Daub, 2009).

Nutrição e tempo de vida apresentam uma ampla conexão. A dieta é determinante para o desenvolvimento e sobrevivência de qualquer organismo, produzindo efeitos significativos sobre a longevidade e as características fisiológicas e metabólicas relacionadas ao envelhecimento (Roberts et al., 2001; Peregrin, 2001; Chrysohooou & Stefanadis, 2013).

Uma restrição alimentar que não cause subnutrição pode retardar o envelhecimento como também promover a longevidade de alguns organismos (Flatt, 2009; Ford, 2013). Resultados assim foram observados em leveduras, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila* criados em meios com menor quantidade de glicose que o usual (Ford, 2013). Em invertebrados, os benefícios da restrição alimentar também atuam positivamente sobre as funções motoras, a resistência ao estresse e a homeostase de proteínas (Lucanic et al., 2013).

Ainda que a restrição alimentar prolongue a vida de forma saudável, ela também provoca uma redução da fecundidade em diversos organismos (Guarente & Picard, 2005). Isto provavelmente ocorre pela realocação de nutrientes da reprodução para a manutenção somática, o que garante maior longevidade (Guarente & Picard, 2005; Flatt, 2009). Tal realocação ocorre, pois esses processos (reprodução e manutenção somática) apresentam elevado custo energético e durante períodos de carência nutricional não há meios de o organismo investir satisfatoriamente em ambos (Partridge et al., 2005; Hansen et al., 2013). A opção pelo investimento em manutenção somática é um mecanismo evolutivo que provavelmente garante a maior chance de sobrevivência em épocas de escassez alimentar na natureza (Guarente & Picard, 2005; Flatt, 2009; Hansen et al., 2013). O investimento em reprodução ou em manutenção somática não é uma escolha deliberada, pois depende de inúmeros mecanismos fisiológicos e genéticos que respondem ao *status* nutricional (Partridge et al., 2005; Guarente & Picard, 2005; Flatt, 2009; Hansen et al., 2013).

Sugere-se que os mecanismos genéticos responsáveis pela extensão do tempo de vida sejam inúmeros e ainda pouco compreendidos (Russel & Kahn, 2007; Piper et al., 2008). Sabe-se que importantes redes gênicas interconectam nutrição e longevidade, como a via da insulina/ fator 1 de crescimento do tipo insulina (IGF1), referida como via IIS, e a via de *Target of rapamycin* (TOR). IIS e TOR constituem um circuito biológico altamente conservado em animais, que promove o crescimento e desenvolvimento quando há boa disponibilidade de alimentos, contudo, reduzindo a longevidade (Edgar, 2006; Russel & Kahn, 2007; Piper et al., 2008; Conn & Qian, 2013; Jewell et al., 2013). Períodos de restrição alimentar inibem TOR e IIS, ocasionando uma melhora da resposta imunológica, uma melhor resistência ao estresse ambiental e o aumento da longevidade (Accili & Arden, 2004; Partridge et al., 2005).

O tempo de vida e o desenvolvimento também apresentam uma complexa regulação pós transcricional. Os microRNAs (miRNAs), reguladores naturais da expressão gênica eucariótica, monitoram e respondem a mudanças ambientais, como temperatura e disponibilidade de nutrientes, promovendo preferencialmente a inibição da tradução de mRNAs alvos (Bartel, 2009; Lynn, 2009; Rottiers & Naar, 2012). Alguns miRNAs afetam múltiplos aspectos do metabolismo, respondendo à presença de lipídeos, glicose e colesterol. Essas moléculas alteram a expressão de genes reguladores da homeostase, modulando, por exemplo, a via IIS e influenciando sobre a longevidade (Lynn, 2009; Rottiers & Naar, 2012; Kato & Slack, 2013).

Muitas pesquisas mostram que miRNAs são essenciais para a determinação da longevidade em *C. elegans* e *Drosophila*. Em *C. elegans*, um aumento da longevidade é ocasionado com a superexpressão de miR-71 e lin-4 (Kato & Slack, 2013), ou com a inibição de miR-239 (Kato & Slack, 2013). Em insetos, miR-125 é homólogo a lin-4 (Garbuzov & Tatar, 2010). MiR-239 e miR-71 possuem papéis antagônicos sobre a via IIS; enquanto o primeiro causa sua ativação, o segundo a reprime, alterando a resposta dos fatores de transcrição da família FoxO (Kato & Slack, 2013). Outros miRNAs atuam na regulação do metabolismo energético garantindo a homeostase e o sensoramento de nutrientes, como miR-14 (Varghese et al., 2010) e miR-278 (Teleman et al., 2006) em *Drosophila*.

Outro fator que apresenta conexão com a temática nutrição-longevidade é o estresse oxidativo (Hekimi et al., 2011). Muitas evidências suportam a relação entre acúmulo de estresse oxidativo e envelhecimento, tais como: aumento do dano oxidativo com o avanço da idade; perda das funções mitocondriais com o progresso do

envelhecimento; aparecimento de doenças relacionadas à idade ligadas a um elevado dano oxidativo; contínua produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelas mitocôndrias ao longo da vida; e redução do estresse oxidativo em função de tratamentos que aumentam a longevidade, como restrições calóricas (Junqueira et al., 2004; Hekimi et al., 2011). Além das mitocôndrias, principal fonte endógena de EROs (Hekimi et al., 2011), a produção de EROs pode ser desencadeada por inúmeros fatores externos, como: radiação UV (Herrling et al., 2006), poluentes, atividade muscular exacerbada e pesticidas (Carocho & Ferreira, 2013). Interessantemente, dietas excessivamente calóricas também estão relacionadas à produção excessiva de EROs (Carocho & Ferreira, 2013), o que é muito evidente no Diabetes Mellitus, em que a condição de hiperglicemia é acompanhada pelo estabelecimento do estresse oxidativo (Dandona & Aljada, 2002; Lin et al., 2005; Ugochukwu et al., 2006; Tachibana et al., 2014).

Apesar dos efeitos danosos ocasionados pela condição de estresse oxidativo, atualmente, é muito bem estabelecido que as EROs desempenham funções celulares vitais. Essas espécies regulam a força e duração da transdução de sinais por meio de processos cíclicos de oxidação/redução em resíduos de cisteína em proteínas cinases, fosfatases e fatores de transcrição, modulando muitas respostas celulares como a expressão gênica (Leonarduzzi et al., 2010; Hekimi et al., 2011; Sohal & Orr, 2012; Martelli & Nunes, 2014). Em condições fisiológicas normais, a geração de EROs, dentro de certos limites, é fundamental para manter a homeostase celular tendo um papel modulador em vias metabólicas, hormonais ou mesmo controlando a atividade de enzimas antioxidantes (Seifried et al., 2007; Hekimi et al., 2011; Sohal & Orr, 2012). Há fortes interconexões entre as cascatas de sinalização de EROs e receptores da via IIS associadas à determinação da longevidade e envelhecimento (Papaconstantinou, 2009; Hekimi et al., 2011).

Em insetos, outra característica que sofre alterações tanto com o status nutricional quanto com a progressão do desenvolvimento adulto é o perfil de hidrocarbonetos cuticulares (*Cuticular Hydrocarbons* - CHC). Os CHC são componentes da cutícula dos insetos. São grupos de alcanos de cadeias lineares, alcanos metil-ramificados, alcenos, alcadienos, entre outros. Os CHC podem ser componentes espécie-específicos e sexo-específicos, que funcionam como uma barreira contra a dessecação e como elementos da comunicação por feromônios (Howard & Blomquist, 2005; Makki et al., 2014). A síntese de CHC pode ser alterada com a idade, o estágio de

desenvolvimento, a linhagem genética e a condição ambiental como temperatura, umidade relativa e alimentação (Howard & Blomquist, 2005; Makki et al., 2014; Falcón et al., 2014). Essas características sinalizam para o uso dos CHC como biomarcadores da progressão do desenvolvimento e do *status* nutricional.

Em ninfas de *Blattella germanica* de mesma idade, o padrão de síntese de CHC é alterado de acordo com o padrão de alimentação, isto é, quanto mais alimento é ingerido, maior a produção de CHC (Young e Schal, 1997). Brei et al. (2004) mostraram que no mosquito *Anopheles stephensi* um avanço de 15 dias de idade adulta aumenta a proporção de alcanos de 31 carbonos em relação a alcanos de 29 carbonos. Isto ajuda a estabelecer a idade do indivíduo e permite relacionar a idade com a capacidade de transmissão do parasita da malária (Brei et al., 2004). Singer (1998) e Xu et al. (2014) mostraram ainda que a complexidade das cadeias de CHC aumentam com o avanço da idade na vespa *Polistes metricus* e no mosquito *Aldrichina grahami*, respectivamente. Ainda, no campo das ciências forenses, os perfis de CHC auxiliam na determinação da idade de moscas que depositam ovos em cadáveres, possibilitando assim calcular o momento da morte de uma pessoa (Roux et al., 2008; Moore et al., 2013).

Compreender a forma pela qual a nutrição influencia características como os perfis de expressão gênica, as características fisiológicas como o acúmulo de estresse oxidativo e o perfil de CHC e, em última instância, a longevidade de um indivíduo, são alguns dos importantes desafios da genética na atualidade. Tais questões suscitaram o desenvolvimento de um novo campo da genética, conhecido por nutrigenômica (Roberts et al., 2001; Peregrin, 2001). Ainda que tais questões sejam bem exploradas por muitas pesquisas, muitos mecanismos moleculares ligados à determinação do tempo de vida ainda não são completamente compreendidos. Além disso, muitas outras questões a nível molecular e a nível fisiológico são formuladas quando se observa os efeitos da alimentação sobre os processos ligados ao envelhecimento. Poucas pesquisas apresentam em uma visão holística da temática nutrição-longevidade, explorando juntos todos os seus aspectos.

1.2. Um modelo de estudo emergente para pesquisas em nutrigenômica

Os insetos representam de 58 a 67% do total de eucariotos conhecidos, possuindo mais de 1 milhão de espécies descritas, com estimativas que chegam a mais de 80 milhões de espécies (Footitt & Adler, 2009). Desempenham um indiscutível papel

ecológico e sobre os recursos naturais, assim como na agricultura e saúde humana (Footitt & Adler, 2009). Seu papel como polinizadores atinge ao redor de 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). Neste âmbito destaca-se a espécie *Apis mellifera*, responsável por polinizar ao redor de 50% das espécies agrícolas no planeta (Klein et al., 2007), além de grande quantidade de plantas nativas. Nos últimos anos as abelhas têm sofrido um desaparecimento progressivo em escala global e sem precedentes, conhecido por Desordem do Colapso de Colônia ou CCD, do inglês *Colony Collapse Disorder* (Stockstad, 2007). Essa desordem é caracterizada por um desaparecimento da maioria das operárias sem que haja vestígios de seus corpos próximos à colmeia (Stockstad, 2007). Muitas hipóteses têm sido apontadas como responsáveis pela CCD, das quais podemos citar: 1- introdução de espécies exóticas; 2 - uso de defensivos agrícolas; 3 - aquecimento global; 4 - parasitas (bactérias e fungos) e 5 - desnutrição (Naug, 2009; Farooqui 2013).

Pelo exposto, fica claro que estudos sobre abelhas e sobre 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. Em abelhas *A. mellifera*, diferentes tipos de dietas são fundamentais na determinação de castas (operárias e rainhas) e na divisão de trabalho das operárias (Winston, 1987). Tal divisão se refere às diferentes tarefas desempenhadas pelas operárias que se alteram em função da idade e ocorrem dentro ou fora das colônias (Winston, 1987). Além disso, o genoma de *A. mellifera* já foi sequenciado (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Elisk et al., 2014), sua biologia é amplamente estudada e suas atividades na colônia são facilmente observáveis (Amdam & Page, 2005; Alaux et al., 2011), o que facilita as pesquisas em nutrigenômica que usam esse organismo como modelo.

Os recursos alimentares de uma abelha adulta restringem-se basicamente a duas fontes: o néctar floral, que garante as suas necessidades energéticas pela riqueza em carboidratos; e o pólen, fonte de nutrientes para o desenvolvimento e crescimento como lipídeos, amido, fibras, vitaminas e minerais (Stanley & Linskens, 1974; Roulton & Cane, 2000), além de ser praticamente a única fonte disponível de proteínas (Haydak, 1970; Amdam & Page, 2005). Entre a primeira e segunda semana de vida adulta, as operárias assumem a função de alimentar as larvas, comportamento que as caracterizam

como nutridoras. Na semana seguinte as operárias processam e estocam alimentos. Por volta de duas a três semanas de idade, as operárias desempenham funções extra-nidais, forrageando em busca de água, resinas e, principalmente, pólen e néctar, período em que são chamadas de forrageiras (Winston, 1987; Page & Peng, 2001).

As mudanças comportamentais e fisiológicas relacionadas às tarefas desempenhadas com o avanço da idade das operárias são acompanhadas por uma mudança na sua dieta (Winston, 1987; Ament et al., 2010). No início da vida adulta, as jovens operárias consomem uma dieta baseada em pólen e carboidratos, e em maior quantidade do que na fase de forrageamento. Nesta fase da vida, as abelhas apresentam metabolismo prioritariamente proteico-lipídico e estocam lipídeos no abdômen (Winston, 1987; Crailsheim et al., 1992; Toth & Robinson, 2005; Ament et al., 2010). Nas jovens operárias que desempenham tarefas de nutridoras, os estoques lipídicos e o consumo de proteínas criam condições ideais para a produção de secreções glandulares utilizadas para alimentar as larvas (Winston, 1987). Nessa fase de nutridora, em que ocorre ganho de peso, a dieta é um importante fator que regula muitas vias gênicas, como a via IIS que apresenta baixos níveis de expressão de peptídeos 1 do tipo insulina (ILP1) e receptores de insulina (InR) (Ament et al., 2008; Ament et al., 2010; Ament et al., 2011; Nilsen et al., 2011).

Várias alterações fisiológicas, hormonais e na expressão gênica caracterizam a maturação comportamental (transição das atividades intra- para extra-nidais) e são consequências do desequilíbrio natural entre ingestão e gasto de energia, causado pela redução na ingestão de alimentos pelas operárias à medida que sua idade avança (Ament et al., 2008; Ament et al., 2011). As forrageiras sofrem uma alteração do metabolismo proteico-lipídico para um metabolismo de carboidratos e, com isso, ocorre uma diminuição na sua capacidade de digerir pólen (Ament et al., 2011). Sua dieta torna-se baseada no mel transferido por trofalaxia pelas nutridoras. As forrageiras passam, ainda, por um aumento do metabolismo energético na musculatura das asas. Isso, associado à perda controlada de 50% do estoque de lipídeos abdominais (Toth & Robinson, 2005) provavelmente melhora sua capacidade de voo (Ament et al., 2011). Além disso, com a transição comportamental, há um aumento gradual dos níveis de hormônio juvenil (HJ) e uma diminuição dos níveis de vitelogenina (Vg) (Page & Amdam, 2007).

As alterações hormonais e nos perfis de expressão gênica durante a transição comportamental influenciam principalmente o cérebro e corpo gorduroso. Os cérebros de forrageiras e nutridoras se diferem na expressão de 40% dos genes (Ament et al.,

2010). O corpo gorduroso dos insetos é um órgão sensor de nutrientes análogo ao fígado e tecido adiposo dos vertebrados (Azeez et al., 2014), responsável pela produção de Vg (Sappington & Raikhel, 1998). Com a transição para a fase de forrageamento, esses órgãos apresentam um aumento gradual da expressão das vias IIS e TOR (Ament et al., 2008; Ament et al., 2010). Acredita-se que, em insetos, os peptídeos do tipo insulina (ILPs) podem ter uma ação catabólica, o que poderia dirigir a perda de lipídeos em *A. mellifera* na transição para o forrageamento (Ament et al., 2008, Nielsen et al., 2011).

Tanto em vertebrados quanto em invertebrados, as vias de TOR e IIS são ativadas em resposta a níveis elevados de nutrientes, atuando como um sinal de retromodulação negativa que inibe o consumo de alimentos. Curiosamente, em abelhas operárias adultas, estas vias atuam na direção oposta: as abelhas jovens, que possuem depósitos de lipídeos e alimentação rica em proteínas, têm menor expressão de IIS e vice-versa (Ament et al., 2010). É possível que a combinação de alta síntese de ILPs e alta sensibilidade à IIS coordene a diminuição da adiposidade durante a maturação comportamental (Ament et al., 2010). Talvez, nesse organismo, IIS seja ainda cooptada por outras vias para regular a divisão do trabalho relacionada à idade. Contudo, a identificação e entendimento dessa e de outras vias no cumprimento de novas funções relacionadas à transição comportamental requerem mais estudos.

1.3. Justificativa

As evidências científicas revelam a, ainda pouco compreendida, complexidade das conexões entre nutrição, estresse oxidativo, expressão gênica, miRNAs e demais processos fisiológicos (entre eles a síntese de hormônios e de hidrocarbonetos cuticulares), os quais são corresponsáveis pelo desenvolvimento e tempo de vida. A maioria dos modelos animais estudados apresenta uma relação bem estabelecida entre o aumento da longevidade e a diminuição da reprodução quando submetidos a restrições alimentares. Contudo, o circuito biológico nutrição-longevidade não está elucidado em organismos prioritariamente inférteis e cuja alimentação varia durante a vida adulta, como é o caso das operárias *A. mellifera*.

Alguns poucos estudos investigaram, de forma sistemática, aspectos fisiológicos e genéticos ligados à progressão do desenvolvimento adulto em operárias *A. mellifera* quando diferentes dietas foram fornecidas. Já se conhece, de longa data, o impacto que diferentes dietas possuem sobre a longevidade desse organismo (Maurizio, 1950; de Groot, 1953; Haydak, 1970). Contudo, é preciso destacar que, em alguns momentos, a

literatura apresenta dados discordantes sobre o efeito de uma dieta proteica, como capaz de reduzir (Ihle et al., 2014) ou estender (Schmidt et al., 1987; Wang et al., 2014) a longevidade dessa abelha. Apesar dos inúmeros esforços, não há uma clareza sobre os mecanismos pelos quais uma dieta poderia afetar a longevidade das operárias. O que aconteceria com as características genéticas e fisiológicas de uma abelha jovem que consumisse uma dieta livre de pólen? A perturbação nutricional impactaria essas características, dando pistas moleculares do porquê de a longevidade ser alterada? A investigação dessas questões é enriquecedora para o campo da nutrigenômica, além de trazer contribuições para os conhecimentos a cerca da biologia desse organismo que é tão importante para a agricultura humana e ecologia.

1.4. Hipótese

Nossa hipótese é a de que uma nutrição livre de pólen (ausente de proteínas) quando oferecida a abelhas operárias jovens da espécie *A. mellifera* reduz sua longevidade porque causa uma antecipação de seu envelhecimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência de diferentes condições alimentares, uma dieta proteica (DP) e uma dieta não proteica (DNP), sobre os aspectos genéticos e fisiológicos da progressão da vida adulta de abelhas operárias *A. mellifera*.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a sobrevivência de operárias submetidas às condições DP e DNP;
- ❖ Avaliar o grau de ativação das glândulas hipofaríngeas de operárias submetidas às condições DP e DNP;
- ❖ Avaliar os perfis de transcriptoma do corpo gorduroso (mRNAs e miRNAs) de operárias submetidas às condições DP e DNP;
- ❖ Validar experimentalmente genes diferencialmente expressos, obtidos a partir dos resultados de sequenciamento em larga escala de corpos gordurosos, de operárias submetidas às condições DP e DNP;
- ❖ Avaliar os perfis transcricionais, em cabeças de operárias submetidas às condições DP e DNP, dos mesmos genes validados em corpos gordurosos;
- ❖ Avaliar o acúmulo de dano oxidativo em corpos gordurosos e cabeças de operárias submetidas às condições DP e DNP;
- ❖ Avaliar os perfis de hidrocarbonetos cuticulares de operárias submetidas às condições DP e DNP.

3. MATERIALE MÉTODOS

3.1. Coleta das abelhas operárias recém-emergidas e desenho experimental

Com o objetivo de avaliar a influência de diferentes condições alimentares sobre os aspectos genéticos e fisiológicos relacionados à progressão da vida adulta de operárias *A. mellifera*, realizou-se um experimento em que um grupo de abelhas foi alimentado com uma dieta proteica (DP) e o outro, com uma dieta não proteica (DNP). Os efeitos desta alimentação diferencial foram avaliados por diferentes abordagens, como análise de sobrevivência, a avaliação do grau de ativação das glândulas hipofaríngeas, a análise do transcriptoma do corpo gorduroso, bem como a análise da expressão de genes específicos em cabeça e corpo gorduroso, quantificação de um marcador de estresse oxidativo na cabeça e no corpo gorduroso e a identificação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares.

Foram utilizadas operárias africanizadas *A. mellifera* provenientes do apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Para obtenção de operárias adultas recém-emergidas, favos contendo adultos faratos (Pbd – pupas de olho marrom com olho completamente pigmentado) foram acondicionados em gaiolas com telas, mantidos em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa. As abelhas que emergiram em um intervalo de 0 a 16 horas foram classificadas como operárias adultas recém-emergidas. Em todos os experimentos, as abelhas foram acondicionadas em caixas de confinamento de 20 cm de altura e 13 cm de largura por 13 cm de comprimento. Estas caixas foram mantidas em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa por sete dias (**Figura 1**). Água e alimentos foram fornecidos a vontade e repostos a cada 24 horas. Verificou-se diariamente a ocorrência de abelhas mortas, as quais eram removidas.

A dieta proteica (DP) é sólida, constituída de 30% de pólen polifloral, 68% de sacarose (açúcar de confeitiro, União) e 2% de mel (Apiário dos Irmãos). O pólen polifloral fresco foi coletado de quadros oriundos do mesmo apiário de origem das abelhas. A sacarose e o mel foram adicionados manualmente ao pólen polifloral e o conteúdo foi misturado até se tornar uma massa homogênea. Tal dieta mimetiza a dieta naturalmente consumida por uma abelha jovem nutridora (Winston, 1987; Crailsheim et al., 1992). A dieta não proteica (DNP) é líquida, constituída 100% de xarope, preparado com 50% de sacarose (açúcar cristal, Guarani) e 50% de água, completamente solubilizado em banho-maria a 60°C. A condição DNP mimetiza a dieta naturalmente consumida por abelhas forrageiras (Winston, 1987; Crailsheim et al., 1992).

Realizaram-se seis experimentos independentes (**Tabela I**). Cada experimento foi formado por uma caixa com operárias na condição DP e outra caixa com operárias na condição DNP. Ainda, cada experimento conteve abelhas provenientes de duas colônias distintas do apiário experimental, com intuito de aumentar a variabilidade genética dos experimentos. A análise do transcriptoma (sequenciamento em larga escala, Illumina-HiScan), foi conduzida a partir de um experimento, com um total de 35 abelhas por caixa. Os experimentos de estresse oxidativo, ensaio de hidrocarbonetos cuticulares, avaliação do grau de ativação das glândulas hipofaríngeas, análise de expressão gênica por RT-qPCR foram conduzidos em triplicata biológica, com cada caixa de confinamento contendo 70 abelhas. Ainda, para elaboração da curva de sobrevivência preparou-se uma duplicata biológica, com cada caixa contendo 70 abelhas.

Após sete dias de confinamento as abelhas foram coletadas e anestesiadas a 4°C por um tempo de 15 minutos. Em seguida, os intestinos foram removidos a partir do ferrão com pinça estéril e descartados. A cabeça (onde há predomínio de cérebro) e a carcaça abdominal (onde há predomínio de corpo gorduroso (Ament et al., 2011)), foram coletadas e armazenadas separadamente para posterior uso no sequenciamento do transcriptoma e RT-qPCR. O material biológico utilizado no ensaio de estresse oxidativo foi utilizado imediatamente após as abelhas serem mortas. As glândulas hipofaríngeas foram dissecadas para a avaliação do grau de ativação. A análise do perfil de hidrocarbonetos cuticulares foi realizada a partir de abelhas íntegras.

Figura 1. Acondicionamento de abelhas operárias em caixas de confinamento. **a:** abelhas criadas sob a condição dieta não proteica (DNP); **b:** abelhas criadas sob a condição dieta proteica (DP); **c:** estufa à 34°C e 80% de umidade relativa.

Tabela I. Desenho experimental. Dieta proteica (DP); dieta não proteica (DNP).

Experimento	Colônias								Avaliou-se
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	DP 35 operárias								Transcriptoma
	DNP 35 operárias								
2			DP 70 operárias						Hidrocarbonetos cuticulares Estresse oxidativo Glândulas hipofaringeanas Expressão gênica pontual
			DNP 70 operárias						
3					DP 70 operárias				Hidrocarbonetos cuticulares Estresse oxidativo Glândulas hipofaringeanas Expressão gênica pontual
					DNP 70 operárias				
4							DP 70 operárias		Hidrocarbonetos cuticulares Estresse oxidativo Glândulas hipofaringeanas Expressão gênica pontual
							DNP 70 operárias		
5				DP 70 operárias					Sobrevivência
				DNP 70 operárias					
6					DP 70 operárias				Sobrevivência
					DNP 70 operárias				

3.2. Quantificação de esporos de *Nosema* sp.

A fim de verificar se as operárias utilizadas nos experimentos 2, 3 e 4 estavam livres dos sintomas da nosebose, uma doença que poderia interferir com os resultados (Chen et al., 2008; Mayack & Naug, 2009), realizou-se a contagem dos esporos de *Nosema* sp. A *Nosema* sp. é um parasita intracelular do filo dos microsporídeos, o patógeno que mais comumente afeta operárias *A. mellifera* adultas em todo o mundo (Higes et al., 2008). De acordo com o protocolo descrito por Cantwell (1970), avaliaram-se sete abelhas de cada condição experimental (DP e DNP) de cada um dos três experimentos independentes. As abelhas foram maceradas em um cadinho com auxílio de um pistilo. Cada grupo de sete abelhas foi macerado em 7 mL de água destilada, o material foi filtrado em funil com algodão e gaze acoplado a frasco Kitassato ligado à bomba de vácuo (**Figura 2**). O filtrado foi homogeneizado e uma alíquota de 10 µL foi utilizada para contagem de esporos em câmara de Neubauer. O número de esporos totais contados nos 25 quadrados centrais foi multiplicado por 10^4 para se calcular o número de esporos por mL.

Figura 2. Preparo das amostras de operárias dos experimentos 2, 3 e 4 para contagem dos esporos de *Nosema* sp. **a:** operárias maceradas em grau com auxílio de pistilo. Dieta proteica (DP), dieta não proteica (DNP); **b:** filtragem do macerado em funil com algodão e gaze acoplado a frasco Kitassato ligado à bomba de vácuo.

3.3. Curva de sobrevivência

Para traçar a curva de sobrevivência foram montadas dois experimentos independentes para cada dieta, as quais foram monitoradas uma vez ao dia sempre no mesmo horário (10h00 am) até que restassem apenas 10% das abelhas, de acordo com o que foi feito por Ihle et al. (2014). As abelhas que se encontravam mortas foram removidas e contabilizadas para o cálculo da curva de sobrevivência. As curvas de sobrevivência obtidas com os dois experimentos de cada dieta, apresentaram perfis similares, de tal foram que os dados foram reunidos e analisadas em uma única curva. A análise de sobrevivência foi realizada pelo método Kaplan-Meier seguido da análise de Log-Rank de Cox-Mantel ($p < 0,05$), conforme Ihle et al. (2014), utilizando-se o *software R* (versão 3.1.2).

3.4. Avaliação do grau de ativação de glândulas hipofaríngeas

Abelhas de sete dias de vida provenientes das duas condições alimentares tiveram suas cabeças dissecadas para retirada das glândulas hipofaríngeas, as quais foram observadas em estereomicroscópio (Olympus), com aumento de 10x. As glândulas hipofaríngeas foram categorizadas de acordo com seu grau de ativação em uma escala arbitrária de 3 pontos: 3- glândulas ativas; 2- glândulas em transição; 1- glândulas inativas (**Figura 3**) Foram analisadas quatro abelhas para cada condição DP e DNP em cada um dos três experimentos independentes. Ácinos de glândulas ativas apresentaram diâmetro de 81-111 μ m, enquanto ácinos de glândulas em transição e glândulas inativas apresentaram diâmetro de 48-74 μ m e 25-46 μ m, respectivamente

(segundo medição realizada neste estudo, em estereomicroscópio, SteREO Discovery.V12, ZEISS, com câmera acoplada, Axiocam MRc5, ZEISS, em aumento de 12x).

A análise dos resultados do grau de ativação das glândulas hipofaríngeas foi realizada com o *software R* (versão 3.1.2). Os resultados dos três experimentos foram reunidos para as análises. Primeiramente realizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), em seguida, para averiguar se as distintas condições nutricionais resultaram em graus de ativação das glândulas hipofaríngeas estatisticamente discerníveis aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (p -bilateral $< 0,05$).

Figura 3. Grau de ativação das glândulas hipofaríngeas. **a:** grau 3 – glândulas ativas; **b:** grau 2 – glândulas em transição; **c:** grau 1 – glândulas inativas. As fotos foram tiradas durante a avaliação das glândulas hipofaríngeas em estereomicroscópio (SteREO Discovery.V12, ZEISS) com câmera acoplada (Axiocam MRc5, ZEISS). Aumento de 12x. Escala correspondente a 100 µm.

3.5. Análise da expressão gênica

3.5.1. Extração de RNA total

As amostras de cabeça e de carcaça abdominal foram colocadas individualmente em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL TRIzol® (Invitrogen) e armazenadas em congelador a -80°C até o momento da extração do RNA total. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e em seguida maceradas com o uso de pistilos. Os microtubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente para lise de membranas e dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g, a 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes de TRIzol® foram transferidos para microtubos de 2 mL, adicionando-se 100 µL de clorofórmio

(Merck). Após agitação manual por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos, os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes (fase transparente, aproximadamente 300 µL) foram transferidos para microtubos de 1,5 mL acrescidos de 250 µL de isopropanol (Merck). Após 10 segundos de vortex e incubação das amostras por 10 minutos à temperatura ambiente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g a 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os produtos precipitados (*pellets*) foram lavados com 500 µL de etanol 75% (Merck) mediante agitação em vortex. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 7.500 x g, a 4°C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os microtubos colocados em termobloco *Digital Dry Bath Incubator* (Boekel) a 55°C, por 5 minutos, para evaporação de etanol residual. Para evitar degradação por RNases, os *pellets* foram ressuspensos em 20 µL de água ultra-pura tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC, 0,1% (v/v), Sigma) e autoclavada. A pureza (estimada por meio da razão entre os valores da leitura a 260 e 280 nm) e concentração (dada em µg/ µL) da solução final de cada amostra foram obtidas por absorvância óptica a 260/280 nm, em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies). As amostras foram então estocadas em congeladores a -80°C até que fossem enviadas para o sequenciamento em larga escala ou até o preparo do cDNA.

3.5.2. Construção e análises de bibliotecas de RNA longos (poliA+) e de pequenos RNAs de corpos gordurosos

Para o sequenciamento em larga escala foram preparados três *pools* de RNAs de corpo gorduroso para cada condição alimentar, de modo que cada um dos *pools* continha RNA de quatro diferentes indivíduos. Utilizou-se 1 µg de RNA total de corpo gorduroso por abelha, de forma que cada *pool* continha 4 µg de RNA total. Este procedimento foi realizado para ambas as condições experimentais analisadas (DP e DNP). O RNA total foi encaminhado para a *facility* de sequenciamento em larga escala instalada no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal) para preparação das bibliotecas de RNAs longos e curtos e sequenciamento na plataforma HiScanTM SQ (Illumina), seguindo as instruções do protocolo *TruSeq RNATM Sample Preparation* (Illumina) (mRNAs) e *TruSeqTM Small RNA Sample preparation* (Illumina) (pequenos RNAs). Os sequenciamentos foram do tipo *single-end*, realizando-se 50

ciclos. Assim, foram produzidas seis bibliotecas de RNA, três DP (DP1, DP2, DP3) e três DNP (DNP1, DNP2, DNP3). Os arquivos resultantes do sequenciamento foram recuperados no servidor de armazenamento local do Laboratório de Biologia e Desenvolvimento de Abelhas após processamento prévio com o *software* Casava v.1.8.1 que faz a avaliação e atribuição do valor de qualidade às bases (*base calling*). O pré-processamento dos dados inclui a eliminação de regiões nas leituras derivadas de artefatos do método de sequenciamento (moléculas adaptadoras) e a avaliação da qualidade das leituras (*reads*). Após a etapa inicial, as sequências foram submetidas a um alinhamento genômico. Este permitiu que fosse realizado o agrupamento das leituras e a montagem dos transcritos gênicos putativos, que foram posteriormente comparados aos transcritos gênicos previamente mapeados e dessa forma identificados. Por fim, esses agrupamentos gênicos foram avaliados, permitindo a estimativa de abundância de leituras para cada amostra biológica. Esses valores representativos da expressão gênica em cada amostra foram então comparados entre si para realizar uma avaliação da expressão gênica diferencial entre as condições biológicas sob investigação. Para filtrar os resultados foi utilizando como critério a razão relativa ($\log_2$ -fold-change) dos valores de expressão normalizados (FPKM – *Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments*) procurando selecionar os genes que mais contribuem para as diferenças nos transcriptomas de corpo gorduroso sob as condições DP e DNP. A seguir, uma descrição mais detalhadas dessas análises.

A eliminação de resquícios de sequências das moléculas adaptadoras foram realizadas utilizando os *softwares* Scythe versão 0.981 (<https://github.com/vsbuffalo/scythe>) para a poda de adaptadores na região 3' ($-p\ 0.05 - n\ 5$) e o CutAdapt versão 1.1 (Martin, 2011) para a poda de adaptadores na região 5' ($--error-rate=0.1\ --times=1\ --overlap=5\ --minimum-length=15$). O programa Scythe utiliza uma implementação do algoritmo Naïve Bayes para a classificação das regiões de alinhamento entre as sequências das leituras e dos adaptadores, considerando a informação de qualidade das bases. Já o programa CutAdapt considera apenas a qualidade e número de bases de identidade desse alinhamento. As leituras que não atingiram o tamanho mínimo de 15 bases foram descartadas.

O programa Prinseq-lite versão 0.19.5 (Schmieder e Edwards, 2011) foi utilizado para podar as leituras removendo as regiões de baixa qualidade (média de qualidade Phred menor que 25 considerando uma janela de 3 bases, deslizando uma base a partir da região 3' da *read*) e as caudas poli(A/T) (mínimo 5 bases A ou T das

extremidades). Após esse processamento, as leituras menores que 15 nucleotídeos ou com bases ambíguas (mais do que 80% de Ns) foram descartadas.

As leituras que passaram na etapa de pré-processamento foram mapeadas na versão 4.5 do genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Elsik et al., 2014) utilizando-se o programa TopHat versão 2.0.7 (Kim e Saltzberg, 2011). Este programa além de alinhar leituras de RNA-Seq no genoma, considera também os mapeamentos em regiões de fronteira de exons. As coordenadas gênicas de referência utilizadas no processo de alinhamento foram obtidas do banco de dados de sequências referências do NCBI (RefSeq v. 55) (Pruitt et al., 2012). Nessa etapa, múltiplos alinhamentos foram descartados utilizando o limiar de exclusão (acima de 10 alinhamentos). Isto foi realizado para evitar mapeamentos ambíguos sem descartar a expressão de alguns genes, de acordo com o recomendado na literatura (Odawara et al., 2011). O programa TopHat foi configurado para realizar um alinhamento priorizando a sensibilidade e a precisão em detrimento da velocidade (*--b2-very-sensitive*). O alinhamento foi realizado por segmentos de 20 nucleotídeos (*--segment-mismatches 2 --segment-length 20*) permitindo no máximo duas substituições (*mismatches*) em todo o alinhamento (*--read-mismatches 2*), com inserção ou deleção de no máximo três nucleotídeos (*--max-deletion-length 3 --max-insertion-length 3*). Para a detecção de alinhamentos em junções de exons, o tamanho de intron considerado deve estar entre 20 e 200.000 bases (*--min-intron-length 20 --max-intron-length 200000*).

Para a montagem dos transcritos gênicos e estimativa de seus valores de expressão em cada condição biológica foi utilizado o programa cufflinks do pacote Cufflinks versão 2.1.1 (Trapnell et al., 2010; Trapnell et al., 2013). O Cufflinks inicialmente precisa definir quais são as estruturas gênicas que estão sendo expressas. Isso é realizado a partir dos fragmentos mapeados. Neste caso foi realizado com o auxílio das coordenadas gênicas previamente definidas (RefSeq, v. 55), ou seja, alinhamentos não compatíveis estruturalmente com os modelos gênicos pré-determinados foram ignorados. A partir daí o Cufflinks estima o valor referente à abundância dos transcritos para cada gene, o FPKM, o qual é análogo ao RPKM (*Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads*) (Mortazavi et al., 2008). Esta medida é um valor normalizado que minimiza os efeitos das diferenças no tamanho dos genes e quantidade de leituras da biblioteca. Portanto, pode-se dizer que esta é a medida de expressão de cada gene. O método de normalização selecionado foi o do quartil superior (*Upper-quartile*) (Bullard et al., 2010). Na etapa de estimativa da expressão, as leituras

mapeadas com TopHat foram agrupadas de acordo com o transcrito ao qual correspondiam, considerando o mapeamento nas coordenadas no genoma. Como foram permitidos alinhamentos múltiplos, outro método de ajuste foi habilitado no Cufflinks. Tal método reestima a abundância das leituras mapeadas múltiplas vezes de forma probabilística de acordo com a estimativa inicial (*--multi-read-correct*), além de considerar viés relacionados à composição de bases dos fragmentos sequenciados (*--frag-bias-correct*), contabilizando todos os alinhamentos válidos (*hits*) para a normalização (*--total-hits-norm*).

Para as análises comparativas de expressão gênica diferencial foi necessário montar uma referência comum com base nas montagens obtidas com Cufflinks para cada biblioteca. Isto é possível usando o cuffmerge, um programa que integra o pacote do Cufflinks. O cuffmerge também associa um identificador do conjunto gênico utilizado como guia a RefSeq v. 55, caso as coordenadas genômicas sejam coincidentes. A partir dos resultados do cuffmerge foram realizadas diversas análises com o programa cuffdiff que também integra o pacote de programas Cufflinks. O cuffdiff testa o *log-fold-change* observado com a hipótese nula de que não há diferença, acessando assim a significância após estimar a variância dos valores de FPKM. Os resultados brutos foram filtrados utilizando um critério de razão relativa de expressão (*abs-log2-fold-change* > 1). Para evitar divisão ilegal por zero, foi adicionado 1 aos valores de expressão (FPKM). Para avaliação da significância estatística das diferenças observadas entre as bibliotecas de RNA longos, foi utilizado o teste proposto por Trapnell et al. (2010).

Para a análise das bibliotecas de RNAs curtos (DP1, DP2, DP3, DNP1, DNP2, DNP3) as leituras de cada biblioteca foram inicialmente submetidas a um processamento que precedeu o alinhamento contra as sequências dos precursores de miRNAs conhecidos. Esse processamento inicial incluiu: 1 - a eliminação de leituras com identidade a sequências de rRNAs, regiões derivadas de artefatos do método de sequenciamento (moléculas adaptadoras), 2 - a avaliação da qualidade e poda das leituras de baixa qualidade e 3 - alinhamento genômico. A primeira etapa desse processamento é a identificação de leituras derivadas de rRNAs e, com essa finalidade, o banco de dados SILVAdb (Quast et al., 2013) foi utilizado como referência no alinhamento realizado com o programa bowtie2 (Langmead e Salzberg, 2012), configurado-o com a opção de sensibilidade intermediária (*--sensitive*) e tamanho de 15 para a semente de alinhamento (*-L 15*). Na etapa seguinte, as leituras são submetidas ao processo de alinhamento genômico com o programa TopHat (1ª); as leituras que foram

alinhadas foram reservadas e as demais submetidas ao programa Scythe e, em seguida, a um novo alinhamento com TopHat (2ª). As leituras alinhadas foram reservadas enquanto as que não se alinham foram submetidas ao programa CutAdapt e, novamente, ao alinhamento com TopHat (3ª). Desse resultado, reservaram-se as leituras alinhadas e submeteu-se as demais ao programa PrinSeq. As leituras que passaram pelos filtros e podas de qualidade foram direcionadas ao alinhamento com TopHat (4ª), reservando as leituras alinhadas e encaminhando as demais para uma segunda execução do CutAdapt, desta vez buscando adaptadores em qualquer região, mesmo no interior das leituras (*--anywhere*). Por fim, as leituras remanescentes até este ponto foram alinhadas com TopHat (5ª). Os parâmetros para podas de baixa qualidade (PrinSeq) e artefatos (Scythe/CutAdapt) foram os mesmos aplicados nas bibliotecas de RNAs longos e descritos anteriormente. No caso do alinhamento genômico com TopHat, os parâmetros alterados foram: redução máxima de múltiplos alinhamentos permitidos (*--max-multihits 10*) e incremento do tamanho dos segmentos na busca (*--segment-length 25*); nas duas primeiras execuções a sensibilidade do alinhamento foi reduzida (*--b2-very fast*) e nas três últimas a sensibilidade foi aumentada (*-b2-D 20 --b2-R 5 --b2-N 0 --b2-L 12 --b2-i S,1,0.35*). Para a etapa final, foi utilizado o programa miRDeep2 (v. 2.0.0.5) (Friedländer et al., 2008) para a quantificação dos miRNAs maduros. Para isso, foram utilizadas todas as leituras alinhadas com TopHat, as quais foram reunidas com as que não tiveram identidade no genoma e que também não foram retidas durante o processamento inicial. Também foram fornecidos ao programa o conjunto de sequências de precursores de miRNAs de *A. mellifera* depositados no miRBase (v. 19) e os alinhamentos convertidos para o formato apropriado, descartando-se os alinhamentos que atravessam junções de exons. As leituras foram colapsadas e contabilizadas para evitar redundância de processamento.

O programa miRDeep2 fornece a quantificação da expressão dos miRNAs nas bibliotecas, através da contagem de leituras que alinham em coordenadas que se sobrepõem à dos miRNAs. O programa original foi alterado para contabilizar apenas o número de fragmentos que estão dentro das coordenadas de mapeamento dos miRNAs maduros, independentemente do precursor. Assim, quando há mais de um precursor com um mesmo maduro em que as leituras alinham, no final a leitura será contabilizada uma única vez para este miRNA. A normalização realizada pelo miRDeep considerou as diferenças na quantidade de leituras mapeadas. As razões relativas de expressão para cada biblioteca foram calculadas utilizando o *log2-fold-change*, após somar 1 a cada

valor na comparação, evitando divisão por zero. Para avaliação da significância estatística das diferenças observadas entre as bibliotecas de RNAs curtos, foi utilizado o teste proposto por Audic & Claverie (1997).

Tanto para as bibliotecas de RNAs longos quanto curtos, foi calculado o *q value*, que corresponde ao *p value* ajustado por testes múltiplos que controlam a taxa de falsas descobertas (FDR, *False Discovery Rate*).

Nota: as análises de bioinformática dos dados brutos do sequenciamento em larga escala foram realizadas pelo Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, Departamento de Tecnologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, e foram acompanhadas sempre que possível.

3.5.3. RT-qPCR de genes selecionados utilizando-se amostras de corpos gordurosos e cabeças

Volumes de RNA total, correspondentes a 2,5 µg, foram completados com água DEPC 0,1% para 10 µL, e utilizados na síntese de cDNA. Tais soluções foram inicialmente tratadas com a enzima *RQ1-RNase free DNase* (Promega) para eliminar possíveis contaminações com DNA. Foi adicionado 0,2 unidades (U) da enzima à solução, que foi incubada a 37°C por 40 minutos e a enzima inativada a 70°C por 15 minutos. O volume final total foi usado como padrão para a síntese de cDNA. A síntese de cDNA foi realizada usando-se o *kit NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR* (Invitrogen) seguindo instruções do fabricante. Em suma, 2,5 µg de RNA total foram primeiramente poli-adenilados conforme se segue: os volumes contendo o RNA total foram completados com água DEPC 0,1% para 12,5 µL. Adicionou-se 2,5 µL de 5x *miRNA Reaction Buffer*, 1,25 µL de 25 mM MnCl₂, 0,5 µL de ATP 10 mM diluído 1:50 em Tris 1 mM (pH 8.0) e 0,25 µL de *Poly A Polimerase*. As reações foram incubadas em termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) a 37°C, por 15 minutos. Em seguida, 4 µL do RNA poli-adenilado foram transferidos para novos tubos, adicionando-se 1 µL de *Annealing Buffer* e 3 µL de *Universal RT Primer* (fornecido pelo *kit*). Estas reações foram incubadas em termociclador a 65°C por 5 minutos e depois colocados no gelo por 1 minuto. Por fim, adicionou-se 10 µL de 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNase OUT™* (Invitrogen), incubando-se a 50°C por 50 minutos, seguido de 85°C por 5 minutos. Como controle

negativo, foram preparadas reações sem a enzima *SuperScript III/RNase OUTTM*. O cDNA produzido nesta etapa serviu de molde para a posterior amplificação de ambos os mRNAs e miRNAs por RT-qPCR. Utilizou-se para produção do cDNA cinco amostras de cabeça e cinco amostras de corpo gorduroso de cada uma dos três experimentos.

As sequências preditas (modelos gênicos) ou validadas em aminoácidos dos genes selecionados para validação foram recuperadas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>): Vg, JHE, Hex70a, Hex110, XP_624408.2 (trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase-like), XP_393528.3 (glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like) e XP_006561863.1 (beta-hexosaminidase subunit beta-like) (**Tabela II**). Essas serviram de base para a identificação de suas localizações na versão 4.5 do genoma de *A. mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Elsik et al., 2007; Elsik et al., 2014) disponível em <http://www.beebase.org>, utilizando-se o algoritmo tblastn. As sequências gênicas foram manualmente anotadas usando ferramentas da plataforma Artemis 7.0 (Rutherford, et al. 2000) para compreensão da organização estrutural dos elementos genéticos. No caso dos genes codificadores de proteínas, a anotação possibilitou o desenho manual de cada oligonucleotídeo específico em exons distintos. Para a validação dos microRNAs, foram selecionados os miR-100, miR-125 e miR-31a, cujos oligonucleotídeos são idênticos às suas respectivas sequências maduras disponíveis no miRBase versão 20 (<http://www.mirbase.org/>), exceto pela substituição da base nitrogenada uracila por timina.

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes codificadores de proteínas foi checada através do alinhamento pelo algoritmo tblastn na base de CDS (*coding DNA sequence*) do *Official Gene Set* (OGS, versão 3.2). Caso os oligonucleotídeos alinhassem em outras sequências com 75% de cobertura e, sobretudo, na sua extremidade 3' o seu desenho seria refeito. Verificou-se ainda a formação de *hairpin*, *self dimer* e *cross dimer* por meio do sítio <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Apenas oligonucleotídeos dentro dos parâmetros estabelecidos foram sintetizados.

Tabela II. Genes codificadores de proteína analisados por RT-qPCR. Na primeira coluna o nome do gene e na segunda coluna o identificador da respectiva sequência de proteína (Protein ID) segundo o *GenBank*.

Gene	Protein ID
Vitelogenina (Vg)	NP_001011578.1
Hexamerina 110 (Hex110)	NP_001094493.1
Hexamerina 70a (Hex70a)	NP_001104234.1
Esterase do Hormônio Juvenil (JHE)	NP_001011563.1
trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase-like	XP_624408.2
glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like	XP_393528.3
beta-hexosaminidase	XP_006561863.1

A eficiência dos oligonucleotídeos sintetizados foi analisada por meio de reações de RT-qPCR. Utilizou-se diluição seriada (1:10) de cDNA e a partir dos valores obtidos construiu-se curvas de regressão linear específicas para cada oligonucleotídeo. O valor *Slope*, fornecido pela curva, foi utilizado para avaliar a eficiência da reação (E) utilizando-se a fórmula $E=10^{(-1/Slope)}$. Em condições ideais, o fator de correlação linear (R^2) entre as concentrações do produto amplificado e os valores de seus ciclos limítrofes (*threshold cycle* – C_T) deve ser o mais próximo de 1. C_T são pontos de cinética da reação que representam, em valores, a quantidade de ciclos de amplificação necessários para detecção da expressão de um gene. Consideraram-se próprios para uso os oligonucleotídeos que com valor *Slope* entre -3.1 e -3.6 (90 a 110% de eficiência) e valor R^2 superior a 0.99 (Livak & Schmittgen, 2001).

A análise de expressão dos genes codificadores de proteínas e miRNAs foi realizada por meio de RT-qPCR. O gene codificador *ribossomal protein L32 (RpL32)* (número de acesso no *GenBank*: NM_001011587.1), cuja expressão é constitutiva ao longo do desenvolvimento (Lourenço et al., 2008), foi utilizado como normalizador das reações de RT-qPCR dos genes codificadores de proteínas. Para normalizar a expressão dos microRNAs, usou-se o U5 snRNA, um componente da maquinaria de ‘spliceossomo’ e indicado na literatura como tendo expressão constitutiva (Schmittgen et al., 2004). A lista de oligonucleotídeos utilizados encontra-se na **Tabela III**. A expressão de todos os genes codificadores e não codificadores de proteínas foi testada na cabeça e corpo gorduroso, com exceção dos genes Hex110 e Hex70a, cuja expressão foi verificada apenas na cabeça. A expressão de Hex110 e Hex70a em corpos gordurosos já foi investigada em trabalhos anteriores com abelhas operárias criadas sob

condições nutricionais muito semelhantes que aquelas utilizadas neste trabalho (Bitondi et al., 2006; Martins et al., 2008).

Tabela III. Informações sobre os oligonucleotídeos desenhados para as análises de expressão gênica.

<i>Locus</i>	<i>Código do primer</i>	<i>Sequência 5' → 3'</i>	<i>Tamanho do amplicon</i>
RpL32	RpL32-F	CGT CAT ATG TTG CCA ACT GGT	150 pb
	RpL32-R	TTG AGC ACG TTC AAC AAT GG	
U5 snRNA	U5-F	CTC TGG TTT CCC TTC AAA TC	74 pb
	U5-R	ATC AAT TGT TCC CCT CCA CG	
Vitелогенина (Vg)	Vg-F	GCA GAA TAC ATG GAC GGT GT	146 pb
	Vg-R	GAA CAG TCT TCG GAA GCT TG	
Hexamerina 110 (Hex110)	Hex110-F	GGC GGA GGA ATT CAG CAA AA	152 pb
	Hex110-R	TGG CCT ACA GGA TTC TGG AT	
Hexamerina 70a (Hex70a)	Hex70a-F	AAA GCC AAT CAC GCT CTG AT	109 pb
	Hex70a-R	AAT CGT GAT TCA GAT ACC AGC	
Esterase do Hormônio Juvenil (JHE)	JHE-F	GTT ATC GCT TCT GAT ATG GCT	122 pb
	JHE-R	GAT GGG AAA TAG GTA CCG AC	
XP_624408.2	GB41912-F	GGT TCT TGG AGA ATA CCC TG	126 pb
	GB41912-R	ACT CCC AAA GTA CCT GAT GG	
XP_393528.2	GB49312-F	ATC ATA ACC CGC TGA CAT CG	121 pb
	GB49312-R	GCA AGC ACT TCC AGA TCA TG	
XP_006561863.1	GB41616-F	CAT ACA GTT TTC GCG TAC AG	122 pb
	GB41616-R	ATC CAT TTG AGG GAG CCA TG	
miR-100	miR-100-F	AAC CCG TAG ATC CGA ACT TGT G	~ 45 pb*
	Reverse	*	
miR-125	miR-125-F	CCC CTG AGA CCC TAA CTT GTG A	~ 45 pb*
	Reverse	*	
miR-31 ^a	miR-31a-F	GGC AAG ATG TCG GCA TAG CTG A	~ 45 pb*
	Reverse	*	

* oligonucleotídeo universal fornecido no kit *NCode™ miRNA First-Strand cDNA*

Synthesis and RT-qPCR (Invitrogen), com sequência não informada.

Para amplificação por RT-qPCR foi utilizado o protocolo do reagente *SYBR® Green* (Applied Biosystems). A reação final consistiu em: 10 µL de solução *SYBR® Green* (Applied Biosystems), 6,4 µL de água deionizada e autoclavada, 0,8 µL de cada primer (10 pmol/µL) e 2 µL da solução de cDNA (diluição 1:10, equivalente a 0,25

µg/µL). As reações foram montadas em triplicatas técnicas e processadas em aparelho 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems), nas seguintes condições para os genes codificadores de proteínas: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto). No caso das reações de RT-qPCR para os microRNAs o ciclo utilizado foi o mesmo usado para os genes codificadores de proteínas, com exceção da duração do passo de 60°C foi de 33 segundos. O ciclo de dissociação para todos os oligonucleotídeos foi 95°C a 60°C (15 segundos em cada grau), 60°C (1 minuto), 60°C a 95°C (15 segundos em cada grau). A especificidade dos produtos de RT-qPCR foi verificada por análise da curva de dissociação para cada amostra. Foram observados picos únicos, que indicaram reações específicas.

A análise estatística dos resultados de RT-qPCR foi feita sobre os valores de ΔCT (Livak & Schmittgen, 2001) utilizando-se o *software R* (versão 3.1.2). Foi utilizado um total de 30 operárias, 15 da condição DNP e 15 da condição DP, ou seja, 5 operárias de cada um dos três experimentos. As triplicatas da condição DNP, ou DP, foram reunidas e analisadas como um só grupo. Inicialmente os resultados de ΔCT foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Uma vez que suas distribuições tivessem sido consideradas normais, usou-se o Teste t de Student ($p < 0,05$), para verificar se a expressão gênica foi estatisticamente discernível entre as condições experimentais. Os histogramas foram gerados em planilhas do *software Microsoft Excel* (Windows 7 Ultimate).

3.6. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos no sequenciamento em larga escala

Para os genes codificadores de proteínas identificados como sendo diferentemente regulados entre as condições DP e DNP e com uma diferença de expressão maior que duas vezes, buscaram-se os ortólogos em *Drosophila melanogaster*. Para tanto, as sequências FASTA das proteínas destes genes de *A. mellifera* foram recuperadas do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e empregadas em um alinhamento contra a base de dados de proteínas de *D. melanogaster* (FlyBase, versão FB2014_06, St. Pierre et al., 2014). Para isto utilizou-se o algoritmo blastp (Altschul et al., 1990).

A tendência funcional dos genes codificadores de proteínas diferencialmente expressos foi realizada utilizando-se o banco de dados do *Gene Ontology* (GO) pelo *software* DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Dennis et al., 2003; Huang et al.,

2009). Este *software* é de livre acesso e foram usados os parâmetros *default*. Utilizou-se a ferramenta *Functional Annotation*, de forma que a análise foi realizada a partir das listas de identificadores das proteínas de *D. melanogaster* (que trazem o prefixo FBpp, seguido de números). Adotou-se o terceiro nível hierárquico da árvore de ontologia por possuir especificidade e abrangência suficientes para identificar processos biológicos relevantes.

3.7. Elaboração das redes de interação proteína-proteína

As mesmas listas de genes superexpressos utilizadas na análise funcional dos resultados do sequenciamento foram utilizadas para a predição das interações proteína-proteína (PPI). Buscou-se pelos ortólogos destes genes no genoma de *D. melanogaster* seguindo os mesmos caminhos descritos no item 3.6, contudo ao invés de FBpps utilizou-se os identificadores dos genes de *D. melanogaster* (que trazem o prefixo CG, seguido de números). As predições de redes PPI foram elaboradas a partir de interações validadas na base de dados BioGRID (v. 3.2.103, Stark et al., 2006). As interações proteína-proteína envolvendo os genes de interesse foram recuperadas da base de dados BioGRID e utilizadas na construção de uma rede de interação por meio da plataforma *Cytoscape* (v. 3.2.0) (<http://cytoscape.org/>).

3.8. Avaliação do acúmulo de marcadores de dano oxidativo

Utilizou-se o ensaio colorimétrico baseado em reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (Sigma-Aldrich®) como parâmetro para estimar o nível de estresse oxidativo de cada indivíduo (em cabeça e em corpo gorduroso) submetido às condições DP e DNP. O *kit* mede a presença de malondialdeído (MDA), um dialdeído de três carbonos com grupos carbonila (C=O) nos carbonos C1 e C3, um dos mais bem conhecidos produtos da oxidação de lipídeos (Onyango & Baba, 2010). O método é baseado na reação do TBA com ácidos graxos poliinsaturados, tal como o MDA, formando um cromóforo rosa (Fernandez et al., 1996). A medição da absorbância das amostras foi feita em placas de 96 poços (Costar®) no espectrofotômetro *DTX880 Multimode Detector* (Beckman Coulter®) a 535 nm utilizando-se o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter®). O ensaio e preparo da curva padrão foram feitos seguindo as instruções do fabricante. Foram analisadas, individualmente, pelo menos 14 corpos gordurosos e 14 cabeças para cada uma das duas condições nutricionais em cada um dos três experimentos realizados.

Uma curva padrão foi preparada em cada placa analisada. Os valores obtidos com a curva padrão foram transferidos para planilhas do *Microsoft Excel (Windows 7 Ultimate)*, onde se elaborou a equação linear da reta ($R > 0.9$). A equação foi então utilizada para se calcular a quantidade de MDA por amostra em cada poço da reação, a partir dos valores de absorbância. Em seguida, utilizou-se a equação: $(S_a/S_v) \times 4 \times D = C$, em que S_a representa a quantidade de MDA de determinada amostra obtida a partir da curva padrão; S_v o volume de amostra por poço; 4 o fator de correção utilizando-se 200 μL de amostra em 800 μL de reação; D o fator de diluição; e C a concentração de MDA por amostra ($\text{nmol MDA}/\mu\text{L}$).

Os dados do ensaio de estresse oxidativo foram analisados pelo *software R* (versão 3.1.2). Os resultados das triplicatas biológicas de cada condição DP e DNP foram reunidos e analisados como um só grupo. Aplicou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificar se os grupos possuíam uma distribuição normal ($p > 0,05$). Para averiguar se as distintas condições nutricionais resultaram em danos oxidativos estatisticamente discerníveis aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p\text{-bilateral} < 0,05$) sobre os resultados dos corpos gordurosos e o Teste t de Student ($p < 0,05$) sobre os resultados das cabeças. Também se aplicou o teste de Correlação Linear de Pearson para verificar se houve alguma correlação entre o dano oxidativo em corpos gordurosos com o dano obtido nas respectivas amostras de cabeça ($p < 0,05$). Os gráficos do tipo *dot plot* foram gerados no *software Prism 5* (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

3.9. Avaliação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares

Foram utilizadas cinco amostras individuais de abelhas para cada uma das duas condições nutricionais em cada uma dos três experimentos independentes analisados. As abelhas foram coletadas em frascos tipo vial de 4 mL (um frasco para cada indivíduo). Em cada frasco com amostra adicionou-se 1,5 mL de n-hexano 95% (Mallinckrodt Chemicals), mantido durante 1 minuto e 30 segundos, a fim de extrair os hidrocarbonetos cuticulares. Em seguida o extrato foi transferido para um frasco de 2 mL com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro (uma para cada amostra, para evitar contaminação). Os frascos secaram *overnight* em fluxo laminar a temperatura ambiente e seu conteúdo foi posteriormente resuspenso em 160 μL de n-hexano. As amostras foram então analisadas em um sistema de Cromatografia em fase Gasosa acoplado a Espectrometria de Massas Shimadzu, modelo GCMS QP2010, equipado com coluna

DB 5MS 30m e hélio como gás carreador a 1 mL/minuto, utilizando o método de ionização eletrônica (as dosagens foram realizadas no Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais, do Departamento de Biologia da FFCLRP-USP). O protocolo de temperatura foi 150°C – 280°C a uma taxa de 3°C/minuto (mantido por 15 minutos a 280°C no fim do processo).

A posição das insaturações nos compostos insaturados foi identificada utilizando-se a técnica de derivatização por dimetil dissulfeto (DMDS) (Carlson, 1989). As amostras (as mesmas utilizadas na extração de hidrocarbonetos) foram secas em frascos de 2 mL, seguindo-se a adição de 200 µL de n-hexano 95%, 200 µL de DMDS (*Sigma-Aldrich*[®]) e 100 µL de solução de iodo 6% em éter etílico. O sistema foi purgado (retirado o ar do frasco) com fluxo de N₂ e depois mantido em agitador magnético *overnight*. O sistema foi transferido para um frasco de 4 mL e diluído em 500 µL de tiosulfato de sódio 5% em água ultra-pura, seguido de agitação em agitador de tubos. A fase superior (orgânica) foi transferida para outro frasco de 4 mL e a água restante foi eliminada com adição de quantidade suficiente de sulfato de sódio (Na₂SO₄), pois este sal absorve a água formando sólidos (blocos) no fundo do frasco, seguido de agitação em agitador de tubos. A fase líquida foi transferida para outro frasco de 4 mL, onde o sistema foi seco, seguido de ressuspensão com 10 µL de n-hexano 95%, dos quais 2 µL foram utilizados para injeção manual no sistema de Cromatografia a Gás acoplado à Espectrometria de Massas *SHIMADZU*, modelo GCMS QP2010 citado anteriormente. A temperatura inicial foi de 80°C, por 2 minutos, seguindo-se até 180°C a uma taxa de 30°C/minuto, seguindo-se a 300°C a uma taxa de 3°C/minuto, mantendo-se nesta temperatura por 80 minutos.

Os cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa *GCMS solutions for Windows* (v. 2.70 - *Shimadzu Corporation*). Os cromatogramas geralmente apresentam vários picos em posições diferentes por conta dos diferentes tempos de retenção (RT) de cada soluto na coluna cromatográfica. Cada pico por sua vez contém todas as informações obtidas pelo espectrômetro de massa. A quantificação foi realizada com base nas áreas de pico obtidas pelos cromatogramas (Singer & Espelie, 1992).

Foi utilizada a análise estatística multivariada de permutações (PerMANOVA) para comparar os grupos experimentais. A análise dos principais componentes foi usada para definir os compostos que mais contribuem para a variação encontrada. Para normalização dos dados, a área de cada pico apontado pelo programa foi transformada de acordo com a seguinte fórmula: $Z = \ln [A_p / g (A_p)]$ onde A_p é a área do pico, $g (A_p)$

é a média geométrica do pico em cada grupo de abelhas e Z é a área transformada do pico (Aitchison, 1982). Adicionalmente, por meio de uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA), calculou-se quais os compostos que melhor explicam a variação encontrada. Uma análise de variância foi realizada, associada ao teste *post hoc* Tukey HSD para se verificar diferenças significativas entre os compostos encontrados e as condições nutricionais. Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas no *software R* (v. 3.1.2).

Nota: as análises de hidrocarbonetos cuticulares foram realizadas pelo doutorando Tiago Falcón, integrante do mesmo grupo de pesquisa, e foram acompanhadas sempre que possível.

4. RESULTADOS

Nota: A partir deste ponto do texto, a dieta proteica será tratada com a sigla DP e a dieta não proteica com a sigla DNP, evitando-se assim excesso de repetições.

4.1. Quantificação dos esporos de *Nosema* sp.

Com objetivo de verificar se as operárias utilizadas em nosso trabalho apresentavam infecção por *Nosema* sp., realizou-se a contagem de esporos desse patógeno. Os resultados são apresentados na **Tabela IV**. Foram analisadas sete operárias de cada um dos três experimentos.

Tabela IV. Contagem de esporos de *Nosema* sp. por mL da solução de macerado de operárias, submetidas à condição DP ou DNP. Sete indivíduos de cada experimento foram utilizados para a contagem.

Experimento	esporos/mL
2 - DP	7×10^4
2 - DNP	4×10^4
3 - DP	5×10^4
3 - DNP	zero
4 - DP	6×10^4
4 - DNP	1×10^4

Em nenhum dos três experimentos o número de esporos superou o valor crítico de 10^5 esporos/mL ou superior que, segundo Chaimanee et al. (2012), caracterizaria a ocorrência nosemore. Os experimentos 5 e 6 também encontravam-se livre dos sintomas da nosemore, uma vez que as colmeias utilizadas em sua montagem foram as mesmas utilizadas nos experimentos 2 e 3 (vide **Tabela I**). Embora as colmeias utilizadas para o experimento 1 não tenham sido checadas diretamente em relação à nosemore, tal experimento, assim como os demais, foi realizado durante os meses de verão, estação do ano com a menor incidência da doença (Fries, 1993). Podemos afirmar, portanto, que os seis experimentos foram conduzidos livres da nosemore.

4.2. Análise de sobrevivência

Devido à similaridade nos resultados de sobrevivência obtidos com os dois experimentos, os dados foram agrupados, compreendendo um total de 140 operárias analisadas sob cada condição nutricional. As diferentes condições nutricionais promoveram efeitos estatisticamente discerníveis sobre a longevidade. Operárias criadas sob a condição DNP viveram por menos tempo que as operárias criadas sob a condição

DP ($p=0,0047$). Enquanto as operárias sob a condição DP atingiram uma margem de menos de 10% de indivíduos vivos ao 27º dia de experimento, as operárias sob a condição DNP atingiram essa marca ao 23º dia (**Figura 4**).

Figura 4. Curva de sobrevivência, em dias, de operárias criadas sob as diferentes condições nutricionais (DP ou DNP). Cada um dos dois grupos alimentares apresenta 140 indivíduos, oriundos de dois experimentos independentes (70 operárias cada). Linha azul – grupo DP; linha vermelha – grupo DNP. Operárias criadas sob a condição DNP viveram menos que operárias criadas sob a condição DP ($p=0,0047$), segundo o método de Kaplan-Meier seguido do teste de Log-Rank de Cox-Mantel, executados no *software R* v. 3.1.2.

A **Figura 5** apresenta um registro fotográfico obtido de um dos experimentos. A figura mostra abelhas mortas removidas no 20º dia e ressalta a diferença morfológica entre as operárias criadas sob as duas condições nutricionais. É possível observar que as abelhas criadas sob a condição DNP apresentavam um abdômen menor que a abelha criada sob a condição DP, bem como uma pigmentação mais escura. Além disso, apesar dessa observação não ser o foco desse estudo, notamos que as operárias criadas sob a condição DNP após aproximadamente 10 dias de experimento apresentaram um comportamento mais agressivo que as operárias do grupo DP, bem como um

comportamento locomotor atípico, como tremores e movimentos repetitivos e frenéticos. São dados adicionais que, no entanto, podem ser considerados para o planejamento de outros trabalhos.

Figura 5. Registro fotográfico de operárias, submetidas à condição DP ou DNP, que morreram ao 20º dia do experimento da curva de sobrevivência.

4.3. Análise do grau de ativação das glândulas hipofaringeanas

O grau de ativação das glândulas hipofaringeanas, de acordo com a escala arbitrária de três pontos criada para esse trabalho (3- glândulas ativas; 2- glândulas em transição; 1- glândulas inativas, **Figura 3**) é apresentado na **Tabela V**. Foram analisadas quatro operárias para cada um dos três experimentos em cada condição nutricional. Observa-se que as operárias do grupo DNP apresentaram um menor grau de ativação das glândulas hipofaringeanas que as operárias do grupo DP (Mann-Whitney, p -bilateral $< 0,0001$). Um total de nove dos 12 indivíduos analisados na condição DP apresentaram o grau 3, enquanto dez dos 12 indivíduos analisados na condição DNP apresentaram o grau 1.

Tabela V. Grau de ativação das glândulas hipofaringeanas, considerando a seguinte escala arbitrária: 3- glândulas ativas, 2- glândulas em transição, 1- glândulas inativas. Condições: DP ou DNP. Foram analisadas amostras provenientes de quatro operárias para cada um dos três experimentos em cada condição nutricional.

Dieta	Grau de ativação		
	3	2	1
DP	10	2	0
DNP	0	3	9

4.4. Análise da expressão gênica em larga escala

4.4.1. Caracterização das bibliotecas de RNAs longos poliA+

O sequenciamento em larga escala do transcriptoma do corpo gorduroso foi realizado para se identificar genes diferencialmente expressos em resposta às duas dietas (ver dados brutos no disco compacto **ANEXO**). A **Figura 6** destaca os valores de expressão de cada uma das seis bibliotecas: três do grupo DP (DP1, DP2, DP3) e três do grupo DNP (DNP1, DNP2, DNP3). Todas as bibliotecas apresentaram perfis e valores altamente reprodutíveis, com médias e variâncias muito similares, evidenciando a robustez e confiabilidade dos dados. De 20 a 36 milhões de *reads* foram geradas por biblioteca.

A análise de clusterização agrupou, com base nos perfis de genes expressos, as triplicatas independentes de uma mesma dieta em um mesmo grupo, portanto as amostras reproduziram perfis biológicos coincidentes (**Figura 7**). Um total de 13.593 genes se expressou nos corpos gordurosos das operárias submetidas às duas dietas. Destes, 581 genes estavam superexpressos na condição DP ($q\text{ value} < 0,05$) e 576 superexpressos na condição DNP ($q\text{ value} < 0,05$) (**Figura 8**). Entre os genes que possuíam uma expressão pelo menos duas vezes maior entre as duas condições ($fold\ change > 2$), 197 estavam superexpressos na condição DP e 139 na condição DNP.

Figura 6. Média ($\log^{10}$ (FPKM)) e desvio padrão dos dados de sequenciamento em larga escala (RNASeq – Illumina HiScan) gerados a partir de *pools* de RNA de amostras do corpo gorduroso de operárias do grupo DP ou DNP. Seis *pools* contendo RNA total do corpo gorduroso de quatro operárias foram preparados em triplicatas biológicas independentes para cada dieta (DP1, DP2, DP3, DNP1, DNP2 e DNP3).

Figura 7. Dendrograma, baseado em distâncias euclidianas, agrupando por semelhança as seis bibliotecas (DNP1, DNP2, DNP3, DP1, DP2, DP3) produzidas no sequenciamento em larga escala (RNASeq – Illumina HiScan).

Figura 8. Diagrama de Venn representando os 13.593 genes codificadores de proteínas expressos em amostras de corpos gordurosos de operárias de sete dias de vida sob as condições DP ou DNP. Foram encontrados 581 genes superexpressos na condição DP e 576 genes superexpressos na condição DNP.

4.4.2. Caracterização das bibliotecas de miRNAs

Da mesma forma para o sequenciamento de RNAs longos poliA+, seis bibliotecas de miRNAs foram produzidas: três do grupo DP (DP1, DP2, DP3) e três do grupo DNP (DNP1, DNP2, DNP3). Houve uma grande variação no número de *reads* (de cerca de 1 milhão a 36 milhões de *reads*) entre as bibliotecas. Dessa forma, a estratégia adotada foi reamostrar 1 milhão de *reads* por biblioteca repetidas vezes. Em todas as reamostragens, os resultados de expressão diferencial foram os mesmos. Foram identificados um total de 183 miRNAs expressos, pelo sequenciamento em larga escala, nos corpos gordurosos das operárias submetidas às duas dietas. Destes, apenas três miRNAs apresentaram uma expressão estatisticamente discernível (*q value* <0,05) entre as condições DP e DNP: miR-31a, miR-100 e miR-125. Os três encontraram-se superexpressos na condição DNP e com *fold change* > 2 (**Tabela VI**).

4.5. Análise da expressão gênica pontual

4.5.1. Validação do sequenciamento em larga escala por RT-qPCR

Para validação, foram selecionados dez genes de interesse que, segundo os dados do sequenciamento em larga escala, diferiram estatisticamente sua expressão (*fold change* > 2 e *q value* < 0,05) entre corpos gordurosos de operárias nas condições de DP e DNP. Tais genes podem ser visualizados na **Tabela VI**, a qual informa os valores de FPKM e *fold change*. Dentre os dez genes selecionados estão as hexamerinas Hex110 e Hex70a. Bitondi et al. (2006) e Martins et al. (2008) estudaram a expressão de Hex110 e Hex70a, respectivamente, em corpos gordurosos de operárias criadas sob condições nutricionais semelhantes às utilizadas neste trabalho. Nestes trabalhos a expressão de ambas as hexamerinas foi maior sob uma alimentação rica em proteínas do que sob uma dieta não proteica. Desta forma, tais dados validam os resultados de sequenciamento em larga escala obtidos em nosso estudo.

A **Figura 9** mostra, dessa forma, a abundância relativa dos oito genes analisados em corpos gordurosos de operárias criadas sob as condições DP ou DNP. Em cada gráfico, cada coluna representa a média de 15 amostras biológicas oriundas de três experimentos independentes (cinco amostras de cada experimento). Os transcritos dos genes: Vg, XP_624408.2, XP_393528.3 e JHE encontraram-se mais expressos em corpos gordurosos de operárias criadas sob a condição DP (Teste t de Student, $p < 0,01$ para Vg, XP_624408.2 e XP_393528.3 e $p < 0,05$ para JHE). Por sua vez, os transcritos dos genes: XP_006561863.1, miR-100, miR-125 e miR-31a encontraram-se mais expressos em corpos gordurosos de operárias criadas sob a condição DNP (Teste t de Student, $p < 0,01$ para XP_006561863.1, miR-100 e miR-125 e $p < 0,05$ para miR-31a). Tais resultados estão de acordo com aqueles obtidos com o sequenciamento em larga escala, confirmando a reprodutibilidade e eficiência do sequenciamento.

Tabela VI. Genes selecionados para validação por RT-qPCR. As colunas **DP** e **DNP** mostram os valores de FPKM calculados a partir do sequenciamento em larga escala. As colunas **DP x DNP** e **DNP x DP** apresentam os valores de *fold change*, indicando quantas vezes os genes estão mais expressos em determinada situação comparada a outra. Todas as diferenças abaixo foram estatisticamente diferentes (*q value* < 0,05).

Genes superexpressos na condição	Genes selecionados	DP	DNP	DP x DNP
	Vg	7068,93	168,83	42
na condição DP	Hex70a	7059,47	82,45	86
	Hex110	1396,99	7,11	196
	JHE	1525,78	103,81	15
	XP_624408.2	680,02	50,28	13
	XP_393528.3	121,64	23,95	5
Genes superexpressos na condição DNP	Genes selecionados	DNP	DP	DNP x DP
	XP_006561863.1	59,69	23,97	2,5
	miR-100	3721,75	1693,27	2,2
	miR-125	2726,37	990,06	2,7
	miR-31a	4572,48	2058,35	2,2

Figura 9. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de oito genes em corpos gordurosos de operárias de sete dias submetidas a diferentes condições nutricionais (DP ou DNP). Cada coluna representa a média de 15 amostras de corpos gordurosos oriundas de três experimentos independentes. A expressão dos genes *RpL32* e *U5* foi utilizada para normalizar a expressão de mRNAs e de miRNAs, respectivamente. Letras diferentes (**a** e **b**) indicam que os resultados foram estatisticamente distintos. Vg, XP_624408.2, XP_393528.3, XP_006561863.1, miR-100 e miR-125 apresentaram $p < 0,01$. JHE e miR-31a apresentaram $p < 0,05$. Teste estatístico t de Student, executado pelo *software R* v. 3.1.2.

4.5.2. Análise da expressão gênica em cabeças por RT-qPCR

Cérebro e corpo gorduroso controlam muitos processos relacionados à longevidade e à transição comportamental em *A. mellifera* (Whitfield et al., 2003; Corona et al., 2007; Ament et al., 2011). Hipotetizamos que alguns genes possam estar expressos em ambos os tecidos, apresentando respostas similares quando as operárias são submetidas a uma mesma dieta. Com intuito de se investigar se estes dois órgãos apresentam perfis similares de expressão, investigou-se em cabeças a expressão dos mesmos genes validados por RT-qPCR em corpos gordurosos. Nesse caso, além dos

oito genes previamente analisados em corpo gorduroso, também se analisou a expressão das hexamerinas Hex110 e Hex70a (**Tabela VI**).

A **Figura 10** mostra a abundância relativa dos dez genes analisados em cabeças de operárias submetidas às condições DP ou DNP. Em cada gráfico, cada coluna representa a média de 15 amostras oriundas de três experimentos independentes (cinco amostras de cada experimento). Os transcritos dos genes: Vg, XP_624408.2 e Hex70a encontraram-se mais expressos em cabeças de operárias criadas sob a condição DP (Teste t de Student, $p < 0,01$), tal como observado em corpo gorduroso. Por sua vez, os transcritos do gene XP_006561863.1 encontraram-se mais expressos em cabeças de operárias criadas sob a condição DNP (Teste t de Student, $p < 0,01$), tal como observado em corpo gorduroso. Os demais genes não apresentaram diferença em seus níveis transcricionais entre as duas condições.

Figura 10. Quantificação relativa dos níveis de transcritos de dez genes em cabeças de operárias de sete dias submetidas a diferentes condições nutricionais (DP ou DNP). Estes genes foram indicados como diferencialmente expressos em corpos gordurosos de operárias submetidas às mesmas dietas (vide **Figura 9**). Cada coluna representa a média de 15 amostras de cabeças oriundas de três experimentos independentes. A expressão dos genes *RpL32* e *U5* foi utilizada para normalizar a expressão de mRNAs e de miRNAs, respectivamente. Letras diferentes (**a** e **b**) indicam que os resultados foram estatisticamente discerníveis ($p < 0,01$). Teste estatístico t de Student executado em *software R* v. 3.1.2.

4.6. Anotação funcional dos genes codificadores de proteínas diferencialmente expressos

Dos 197 genes codificadores de proteínas superexpressos na condição DP, e dos 139 genes codificadores de proteínas superexpressos na condição DNP, 140 e 90 apresentaram ortólogos com anotação funcional no genoma de *D. melanogaster*, respectivamente. Estes dados permitiram a identificação de processos biológicos enriquecidos em cada um das condições nutricionais testadas (**Tabela VII**). Adotou-se o terceiro nível hierárquico da árvore de ontologia, proposta no *software* DAVID (versão 6.7). Neste nível, o *software* conseguiu categorizar 58 dos 140 ortólogos identificados da condição DNP e 26 dos 90 ortólogos identificados na condição DP. Operárias de sete dias de vida adulta tratadas sob a condição DP apresentaram prevalência de termos relacionados a metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, assim como de termos ligados à regulação do sistema imunológico. Por outro lado, operárias de sete dias de vida adulta tratadas sob a condição DNP apresentaram prevalência de termos relacionados a desenvolvimento celular e neural, migração celular e resposta a estímulos xenobióticos.

Tabela VII. Termos enriquecidos em análise de *Gene Ontology* (terceiro nível hierárquico), utilizando o *software* DAVID v.6.7 para a lista de genes diferencialmente expressos obtida com o sequenciamento em larga escala (RNASeq – Illumina HiScan), em corpos gordurosos de operárias de sete dias submetidas às condições DNP ou DP.

	Termo	nº de genes
Condição DNP	movimento celular	8
	orientação de axônios	5
	desenvolvimento celular	10
	desenvolvimento de tecidos	7
	resposta a estímulos xenobióticos	2
	organização de grânulos de pigmentos	2
	processos metabólicos de xenobióticos	2
	processos metabólicos de toxina	2
	processos homeostáticos	4
	processos metabólicos de compostos celulares aromáticos	3
	migração celular	4
	desenvolvimento de projeções neuronais	5
	diferenciação celular	11

Condição DP	processos metabólicos de ácidos orgânicos	14
	processos metabólicos celulares de cetonas	14
	processos metabólicos de aminoácidos	13
	processos metabólicos de aminoácidos e derivados	10
	processos metabólicos de compostos celulares aromáticos	6
	processos metabólicos celulares de lipídeos	8
	processos metabólicos de lipídeos	10
	processos metabólicos e terpenóides	3
	regulação da resposta imunológica	4
	resposta de defesa	7
	resposta imune humoral	5
	resposta a outros organismos	6
	processos catabólicos de lipídeos	4
	processos metabólicos heterocíclicos	8
	processos metabólicos celulares de hormônios	3
	resposta imunológica inata	5
	resposta a toxinas	3
	regulação de processos do sistema imunológico	4
	regulação da resposta ao estresse	4
	regulação da resposta humoral antimicrobiana	3
	regulação de processos multi-organismo	3
	regulação da resposta a estímulos bióticos	3
	resposta a fungos	3
	resposta humoral antimicrobiana	4
	processos catabólicos hormonais	2
	processos metabólicos de carboidratos	9
	regulação dos níveis hormonais	3
	regulação positiva de processos biossintéticos	5
	processos metabólicos de monossacarídeos	4
	processos celulares catabólicos	8
	regulação positiva de processos metabólicos celulares	5
	regulação positiva de processos metabólicos	5
	regulação da resposta a estímulos	4

4.7. Análise das redes de interação proteína – proteína

Para melhor compreender como as diferentes dietas afetaram vias metabólicas do corpo gorduroso, foram geradas redes baseadas em interações proteína-proteína (PPI). Tais redes (**Figura 11 e 12**) foram produzidas na plataforma *Cytoscape* (v. 3.2.0) a partir dos 140 ortólogos identificados em *D. melanogaster* para a condição DP e 90 para a condição DNP.

Ainda que com a ressalva de que as redes geradas sejam baseadas em interações bem estabelecidas para o modelo *D. melanogaster*, assumiu-se a proximidade evolutiva

desses Hexapoda e a conservação das funções dos genes. Os resultados demonstram uma gama de interações muito menor e menos complexa resultante da lista da condição DNP (**Figura 11**) quando comparada a lista da condição DP (**Figura 12**). Os seis pontos mais conectados de cada rede (chamados *hubs*) estão em destaque nas figuras. Tais *hubs* são apresentados na **Tabela VIII**.

Figura 11. Rede de interações proteína-proteína (PPI) gerada pela plataforma *Cytoscape* com os ortólogos de *D. melanogaster* referentes aos genes superexpressos no corpo gorduroso de operárias submetidas à condição DNP. Círculos azuis (*hubs*) - proteínas com maior número de conexões (CG11138; CG10160; CG2674; CG5178; CG15884; CG1322); círculos cinza - proteínas codificadas pelos genes introduzidos pelo usuário da plataforma ou, proteínas introduzidas pela base de dados BioGRID (v. 3.2.103) que apresentam interações com aquelas introduzidas pelo usuário.

Figura 12. Rede de interações proteína-proteína (PPI) gerada pela plataforma *Cytoscape* com os ortólogos de *D. melanogaster* referentes aos genes superexpressos no corpo gorduroso de operárias submetidas à condição DP. Círculos amarelos (*hubs*) - proteínas com maior número de conexões (CG9986; CG6058; CG2852; CG32031; CG5848; CG9331); círculos cinza - proteínas codificadas pelos genes introduzidos pelo usuário da plataforma ou, proteínas introduzidas pela base de dados BioGRID (v. 3.2.103) que apresentam interações com aquelas introduzidas pelo usuário.

Tabela VIII. Seis principais *hubs* encontrados nas redes de interações proteína-proteína (PPI) para cada uma das condições alimentares (DP ou DNP). A coluna um indica o *Annotation symbol* (CG) de *D. melanogaster*, recuperado da base de dados *FlyBase*. A coluna dois indica o número de interações proteicas dos *hubs*. As colunas três e quatro apresentam o identificador do transcrito no GenBank (*GenBank ID*) e a anotação do gene, ambas em *A. mellifera*.

	<i>Annotation symbol</i> <i>FlyBase</i>	Número de interações do <i>hub</i>	<i>GenBank ID</i> (<i>A. mellifera</i>)	Anotação (<i>A. mellifera</i>)
hubs DP	CG9986	139	XM_001119831.3	<i>leucine-rich repeat neuronal protein 3-like</i>
	CG6058	89	XM_001121298.3	<i>fructose-bisphosphate aldolase (LOC725455)</i>
	CG2852	65	NM_001242544.1	<i>peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) (Ppib)</i>
	CG32031	57	NM_001011603.1	<i>arginine kinase (Argk)</i>
	CG5848	42	XM_001121575.3	<i>NF-kappa-B inhibitor cactus-like</i>
	CG9331	37	XM_393528.4	<i>glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase-like</i>
	CG11138	66	XM_393365.5	<i>interferon regulatory factor 2-binding protein 2-like</i>
hubs DNP	CG10160	54	XM_394662.5	<i>L-lactate dehydrogenase (LOC411188)</i>
	CG2674	18	XM_623666.3	<i>s-adenosylmethionine synthase-like</i>
	CG5178	17	XM_001121258.2	<i>actin, indirect flight muscle-like (LOC725404)</i>
	CG15884	15	NM_001270829.1	<i>cuticular protein 27 (CPR27)</i>
	CG1322	14	XM_006557341.1	<i>zinc finger protein 1-like</i>

4.8. Avaliação do acúmulo de estresse oxidativo

O nível de estresse oxidativo foi aferido por meio do ensaio *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (Sigma-Aldrich®) que avalia o acúmulo de malondialdeído (MDA), um produto da oxidação de ácidos graxos (Esterbauer et al., 1991).

Os resultados obtidos com os três experimentos foram reunidos e analisados conjuntamente. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (**Tabela IX**). Uma vez que, os resultados obtidos com os corpos gordurosos

apresentaram uma distribuição não normal ($p < 0,05$) a diferença entre os grupos DNP e DP foi avaliada por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (**Tabela IX**). Por outro lado, a distribuição dos valores de dano oxidativo na cabeça foi normal ($p > 0,05$) e, dessa forma, a diferença entre os grupos DNP e DP foi avaliada por meio do Teste t de Student (**Tabela IX**).

Tabela IX. Resultados de acúmulo de marcadores de dano oxidativo (nmol MDA/ μ L) obtidos em amostras de cabeças e corpos gordurosos de operárias de sete dias submetidas às condições DNP ou DP. Testes estatísticos realizados usando o (*software R v. 3.1.2*).

Orgão	Grupo	n° de amostras	Média de nmol MDA/ μ L	Shapiro-Wilk (p-valor)	Teste estatístico	Teste linear de Pearson	
						r *	P
Corpo gorduroso	DNP	46	$0,388 \pm 0,268$	$2,881e-05$	$p < 0,01$ (Mann-Whitney (p-bilateral))	-0,07	0,640
	DP	45	$0,211 \pm 0,086$	0,02553			
Cabeça	DNP	44	$0,162 \pm 0,067$	0,6136	$p > 0,05$ (t de Student (p-valor))	0,46	0,002
	DP	45	$0,153 \pm 0,065$	0,7231			

* valores de r (Pearson) próximos de 1 ou -1 indicam uma alta correlação positiva ou negativa, respectivamente, entre os resultados.

Os resultados do ensaio de MDA em amostras de corpos gordurosos para os três experimentos são apresentados na **Figura 13**, e os respectivos resultados de amostras de cabeças são apresentados na **Figura 14**. Como se podem observar na **Figura 13 a** e **Tabela IX**, os resultados obtidos em corpos gordurosos foram estatisticamente discerníveis entre os grupos DP e DNP. Dessa forma, uma parcela das amostras de corpos gordurosos de operárias criadas sob a condição DNP (16 das 46 amostras totais, ~ 35%) apresentou um acúmulo de MDA acima de um limiar de 0,5 nmol MDA/ μ L. Resultado que foi observado no grupo DNP nos três experimentos (**Figura 13 b**). Nota-se que estes pontos distanciam-se dos demais pontos dentro de seu grupo experimental, criando um intervalo de valores (ao redor de 0,4 e 0,6 nmol MDA/ μ L) que não é ocupado por nenhuma amostra.

Figura 13. Concentração de MDA em nmol/μL em corpos gordurosos de operárias com sete dias de vida, criadas sob as condições DP ou DNP, mensurada pelo ensaio *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (Sigma-Aldrich®). Cada ponto representa uma amostra individual de corpo gorduroso. **a:** resultado reunindo os três experimentos sobre o qual foi aplicado o teste estatístico; **b:** perfil independente dos três experimentos. Linha cinza delimita o intervalo de valores que não é ocupado por nenhuma amostra. Asterisco (*) indica resultado estatisticamente discernível (p-bilateral < 0,01). Teste de Man-Whitney (software R v. 3.1.2).

No tocante ao acúmulo de marcadores de estresse oxidativo na cabeça, como é possível observar na **Figura 14 a**, os resultados apresentaram perfis muito semelhantes entre as duas dietas, não sendo estatisticamente discerníveis (**Tabela IX**). Dessa forma, o dano na cabeça ocorreu nos dois grupos de forma similar e independente da dieta, ou

ainda, ambas as condições provocaram o mesmo nível de dano. A **Figura 14 b** ressalta que todos os experimentos reproduziram um perfil de acúmulo de dano oxidativo muito semelhante.

Comparando **Figuras 13 e 14** é possível notar também que, independentemente da condição alimentar, o acúmulo de MDA foi menor em cabeças do que em corpos gordurosos. Enquanto em corpos gordurosos esse valor variou de 0 a 1 nmol MDA/ μ L em cabeças os valores variaram de 0 a 0,35 nmol MDA/ μ L. Com intuito de verificar se haveria alguma correlação entre o acúmulo de dano oxidativo nos corpos gordurosos e nas respectivas amostras de cabeças realizou-se o teste de Correlação Linear de Pearson. O resultado do teste indicou não haver correlação entre o acúmulo de MDA entre esses dois órgãos em nenhuma das condições nutricionais (**Tabela IX**). Dessa forma, os dados indicam que o acúmulo de dano oxidativo na cabeça é independente do dano acumulado no corpo gorduroso.

Figura 14. Concentração de MDA em nmol/ μ L em corpos gordurosos de operárias com sete dias de vida, criadas sob as condições DP ou DNP, mensurada pelo ensaio *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (Sigma-Aldrich®). Cada ponto representa uma amostra individual de cabeça. **a:** resultado reunindo os três experimentos sobre o qual foi aplicado o teste estatístico; **b:** perfil independente dos três experimentos. Asterisco (*) indica resultado estatisticamente discernível (p-bilateral<0,01). Teste de Man-Whitney (software R v. 3.1.2).

4.9. Avaliação do perfil de hidrocarbonetos cuticulares

Assim como nas análises anteriores, as diferentes condições nutricionais testadas também foram capazes de, em apenas sete dias, alterar a composição de hidrocarbonetos cuticulares (*Cuticular Hydrocarbons* – CHC) de operárias. Uma análise de coordenadas

principais (**Figura 15**) revela que operárias tratadas sob a condição DNP apresentaram uma distribuição quantitativamente distinta de operárias tratadas sob a condição DP, discriminando, assim, os grupos. Foram identificadas quatro classes de hidrocarbonetos: n-alcenos, metil-alcenos, alcenos e alcadienos, com cadeias carbônicas que variaram de 18 a 35 carbonos nas operárias submetidas às duas condições nutricionais.

A **Figura 16** apresenta a proporção de cada uma das quatro classes de CHC encontradas por condição nutricional. As classes de n-alcenos (**Figura 16 a**) e de metil-alcenos (**Figura 16 b**) apresentaram uma maior proporção na condição DNP do que DP ($p < 0,05$). Por outro lado, a classe de alcenos (**Figura 16 c**) apresentou maior proporção na condição DP do que DNP ($p < 0,05$). A classe de alcadienos (**Figura 16 d**) não apresentou uma proporção estatisticamente discernível entre os dois grupos.

Analisando-se os compostos individualmente, descobriu-se que o grupo DNP mostrou uma maior proporção de um alceno de 23 carbonos ($p < 0,05$) e um alceno de 28 carbonos (**Figura 17 a e 17 b**). O grupo DP, por sua vez, apresentou uma maior proporção de um alceno de 33 carbonos e de duas moléculas distintas de alcenos de 35 carbonos, referidas como a e b, ($p < 0,05$) (**Figura 17 c, 17 d e 17 e**).

Figura 15. Análise de coordenadas principais de perfis de CHC de operárias discriminando as condições nutricionais DP e DNP. O centroide é marcado em vermelho para cada condição nutricional. Linhas tracejadas - limitam as amostras dentro de cada grupo; linhas azuis - ligam as amostras aos centroides; triângulos - somatório de dados de CHC de cada operária do grupo DNP; círculos - somatório de dados de CHC de cada operária do grupo DP. Teste PerMANOVA (Pseudo-F = 11,161; $p < 0,05$) (software R v. 3.1.2).

Figura 16. Proporção das classes de CHC identificadas em operárias de sete dias submetidas às condições nutricionais DP ou DNP. Cada coluna representa a média de 15 abelhas oriundas dos três experimentos independentes. **a:** n-alkanos; **b:** metil-alkanos; **c:** alkenos; **d:** alcadienos. Letras diferentes (a e b) indicam que os resultados foram estatisticamente distintos ($p < 0,05$). Teste estatístico ANOVA um critério, seguido do teste *post hoc* Tukey-HSD (software R v. 3.1.2).

Figura 17. CHC diferencialmente representados em cutículas de operárias de sete dias submetidas às condições DP ou DNP. Cada coluna representa a média de 15 operárias oriundas de três experimentos independentes. **a:** alceno de 23 carbonos; **b:** alceno de 28 carbonos; **c:** alceno de 33 carbonos; **d:** alceno de 35 carbonos a; **e:** alceno de 35 carbonos b. Letras diferentes (a e b) indicam que os resultados foram estatisticamente distintos ($p < 0,05$). Teste estatístico ANOVA um critério, seguido do teste *post hoc* Tukey-HSD (*software R* v. 3.1.2).

Neste trabalho avaliamos a influência de duas condições alimentares sobre algumas características fisiológicas e genéticas relacionadas à progressão do desenvolvimento adulto de operárias *A. mellifera*. Em nosso *design* experimental desenvolvemos seis experimentos para cada condição alimentar. Cada experimento foi formado por operárias de duas colmeias distintas. Tal abordagem nos permitiu identificar as respostas comuns, dentro de *pools* com alta variabilidade genética, frente a cada uma das condições alimentares testadas. Nossos resultados apontaram que as diferentes dietas testadas são suficientes para desencadear fenótipos distintos em abelhas operárias de mesma idade (sete dias). Em resumo, operárias do grupo DP assemelham-se às abelhas mais jovens (como as nutridoras), enquanto operárias do grupo DNP assemelham-se às abelhas mais velhas (como as forrageiras). Essas relações estão discutidas, em maior detalhe, nos parágrafos que se seguem.

Como ponto de partida, avaliamos se as operárias das colônias utilizadas em nossos experimentos apresentavam a nosemose. Tal patologia apícola é causada por microsporídeos do gênero *Nosema*. É uma das doenças mais frequentes que acometem abelhas *A. mellifera* adultas, causando perdas econômicas significativas aos apicultores em todo o mundo (Higes et al., 2008). A *Nosema* compete pelos recursos nutricionais de seu hospedeiro, acarretando distúrbios digestivos e alterando o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos (Chen et al., 2008; Mayack & Naug, 2009). Além disso, a nosemose suprime a resposta imunológica e reduz os níveis de vitelogenina, fatores relacionados à diminuição da longevidade e da resistência ao estresse oxidativo (Amdam et al., 2004; Seehuus et al., 2006; Antúñez et al., 2009). Nossos resultados indicaram que as operárias utilizadas em nossos experimentos estavam livres dos sintomas da nosemose. Isso nos permite afirmar que os resultados gerados no presente estudo são respostas genuínas às diferentes condições nutricionais.

5.1. Dieta sem proteínas reduz a longevidade de operárias

A dieta tem um impacto significativo na longevidade de operárias (Maurizio, 1950; de Groot, 1953; Haydak, 1970). O consumo insuficiente de pólen nos primeiros oito à 10 dias de vida adulta compromete o desenvolvimento de órgãos (como glândulas hipofaringeanas e corpo gorduroso), a resposta imunológica e reduz a longevidade, devido, sobretudo à carência de nitrogênio (Haydak, 1970; Winston, 1987; Brodschneider & Crailsheim, 2010; Alaux et al., 2011). Este resultado, contudo não é unânime na literatura científica. Ihle et al. (2014) observaram que operárias *A. mellifera*

vivem por muito mais tempos quando criadas em gaiolas sob dieta rica em carboidratos (xarope de sacarose 50% e 2% de solução de aminoácidos) do que sob dieta proteica (xarope de sacarose 10%, 30% de solução de aminoácidos e 1% de mistura de lipídeos). Por outro lado, trabalhos como de Rinderer & Elliot (1977), Schimidt et al. (1987), Di Pasquale et al. (2013) e Wang et al. (2014) observaram que operárias *A. mellifera* sobrevivem mais em dietas proteicas (enriquecidas com pólen) do que dietas exclusivas de carboidratos. Ainda que alguns trabalhos tenham observado a redução da longevidade em função da dieta, os parâmetros utilizados para mensurar tal efeito não abrangem toda a complexidade que se espera para este evento biológico. A principal finalidade desse estudo foi utilizar, além de métodos clássicos, outras abordagens, na tentativa de integrar e reconciliar informações que respondam a essa questão. Outro diferencial é que exploramos a potencial integração de dois tecidos, cérebro (um centro cognitivo) e corpo gorduroso (um centro metabólico), enquanto os trabalhos vigentes investigaram um ou o outro tecido (o que gera interpretações parciais), ou o animal inteiro (o que gera interpretações confusas ou equivocadas).

Nossos achados apontaram que as abelhas operárias da condição DNP viveram menos do que as operárias da condição DP. Esse resultado está em acordo com a maior parte da literatura científica. Tal redução na longevidade poderia se dar por um investimento na reprodução, conforme discutido na Introdução. Uma vez que, as operárias são facultativamente estéreis, tal possibilidade deve ser descartada. Cabe aqui resgatar nossa hipótese: acreditamos que a redução na longevidade se dá por processos de envelhecimento precoce, desencadeado por um determinado tipo de dieta.

5.2. Dieta sem proteínas mantém inativas as glândulas hipofaríngeas de operárias de sete dias

As glândulas hipofaríngeas constituem um par de glândulas presentes na cabeça das operárias que produzem secreções utilizadas para nutrir o desenvolvimento de crias e operárias jovens (Winston, 1987). O estado de ativação das glândulas hipofaríngeas é dependente da nutrição, sendo o consumo de pólen fundamental para seu completo desenvolvimento (Crailsheim, 1990).

Di Pasquale et al. (2013) e Corby-Harris et al. (2014) observaram que operárias recém-emergidas alimentadas com dieta suplementada com pólen por sete dias em gaiolas e oito dias em colônias, respectivamente, apresentam maior grau de ativação das glândulas hipofaríngeas do que operárias alimentadas em dieta livre de pólen. Em

nosso trabalho observamos que as glândulas hipofaringeanas de operárias submetidas à DNP não atingiram o maior grau de ativação, ao contrário das operárias submetidas à condição DP. Tal resultado é coerente com a carência de proteínas na alimentação deste grupo de abelhas. Durante a progressão da vida adulta, as glândulas hipofaringeanas se ativam nas jovens operárias e posteriormente se atrofiam com a transição para tarefas como o forrageamento (Crailsheim & Stolberg, 1989). As operárias do grupo DNP não chegam a ativar e degenerar as glândulas hipofaringeanas. É possível aventar a hipótese de que essa ausência de ativação da glândula é fisiologicamente interpretada pelo organismo como um sintoma de senescência, que culmina na sinalização de outros processos de envelhecimento ocorrendo em paralelo em outros tecidos. Nossos resultados corroboram aqueles já observados em outros trabalhos (Di Pasquale et al., 2013; Corby-Harris et al., 2014). Ambos os estudos foram publicados recentemente, durante a execução de nosso projeto. Ainda que tenhamos perdido a originalidade do dado, mantivemos a avaliação do grau de ativação das glândulas hipofaringeanas em nosso estudo pois esta serviu como um parâmetro de controle que valida nossos experimentos.

5.3. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos no sequenciamento em larga escala

Identificamos, por sequenciamento em larga escala, um total de 13.593 genes codificadores de proteínas transcricionalmente ativos nos corpos gordurosos de operárias criadas nas duas dietas, o que corresponde a aproximadamente 89% dos 15.314 genes codificadores de proteínas atualmente identificados no genoma de *A. mellifera* (Elsik et al., 2014). Destes, 197 genes foram superexpressos na condição DP e 139 na condição DNP. A anotação funcional baseada no *Gene Ontology* mostrou uma prevalência de termos ligados ao metabolismo de lipídeos, de proteína e de carboidratos e à regulação do sistema imunológico nas operárias do grupo DP. Alguns trabalhos reportaram que operárias nutridoras apresentam uma resposta imunológica mais eficiente que forrageiras, como maior número de hemócitos na hemolinfa (Amdam et al., 2005), assim como maior expressão de genes ligados ao metabolismo de lipídeos e proteínas, segundo análises de transcriptoma do corpo gorduroso (Ament et al., 2011). Termos ligados a resposta imunológica e metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas também foram identificados por Alaux et al. (2011) como superexpressos no transcriptoma de abdomens (incluindo trato digestivo) de operárias *A. mellifera* criadas

por oito dias em dieta artificial de candy (70% açúcar e 30% mel) com pólen se comparadas a operárias alimentadas exclusivamente com candy.

Por sua vez, as operárias do grupo DNP mostraram prevalência de termos relacionados à diferenciação celular, migração celular, desenvolvimento celular e de tecidos e respostas a estímulos. Termos relacionados a estes, tais como regulação do desenvolvimento, crescimento, morfogênese, estrutura e localização celular, foram identificados por Ament et al. (2011) quando analisaram o perfil de expressão gênica de corpos gordurosos de operárias forrageiras por *microarray*. A resposta a estímulos é também uma característica marcante de forrageiras, uma vez que a percepção e interpretação de sinais ambientais são essenciais para o voo e forrageamento (Seeley, 1994; Robinson et al., 2002). Curiosamente, genes associados ao termo “resposta a estímulos” se expressaram em operárias de sete dias mantidas em gaiolas sem contato com o ambiente externo. A única variável ambiental foi a dieta, sugerindo que o fator nutricional é forte o suficiente para promover, sozinho, a alteração de fenótipos.

Identificamos na condição DP, por exemplo, a superexpressão de *Odorant binding proteins* Obp3 (NP_001035311.1) e Obp14 (NP_001035313.1), importantes para o transporte de moléculas de odores e feromônios hidrofóbicos, cuja expressão é marcante da fase de nutridoras (Liu et al., 2011), reforçando que a condição DP aproximou as operárias de sete dias (utilizadas nesse estudo) ao fenótipo de nutridoras. Encontramos ainda a superexpressão das glutationsas S-transferase GstU1 (XP_001121730.2) e GstS1 (NP_001153742.1), participantes no combate ao estresse oxidativo (Papadopoulos et al., 2004), demonstrando uma defesa antioxidante mais eficiente nos indivíduos do grupo DP. A superexpressão numa dada condição também pode significar uma inibição na outra condição sob comparação. Ou seja, as glutationsas, se interpretadas como menos expressas nas abelhas do grupo DNP, indicam um comprometimento da defesa antioxidante, culminando em estresse oxidativo e envelhecimento precoce.

No tocante à condição DNP, destacamos aqui alguns genes superexpressos no corpo gorduroso, como *malvolio* (Mvl, XP_006563114.1) e *phosphoenolpyruvate carboxykinase* (Pepck, XP_006560527.1). Alaux et al. (2011) também encontraram resultado semelhante para Mvl. A expressão de Mvl está ligado à responsividade a açúcares (Orgad et al., 1998) e está envolvida com a divisão do trabalho relacionado à idade em *A. mellifera*, sendo mais expresso no cérebro de forrageiras do que de nutridoras (Ben-Shadar et al., 2004). Isso vai de encontro a uma atividade de expressão

gênica coordenada entre cérebro e corpo gorduroso, a qual propomos nesse estudo. Pepck, por sua vez, é codificador da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase e participa da via da gliconeogênese e da ativação da via da insulina (Stark & Kibbey, 2014). Em forrageiras, o metabolismo energético é baseado em carboidratos e ocorre um aumento da expressão da via IIS em relação à fase de nutridora (Ament et al., 2008; Ament et al., 2010). A elevada expressão de Mvl e Pepck em nosso trabalho reforça o efeito da condição DNP sobre a indução, aos sete dias, de um perfil transcricional relacionado ao de operárias mais velhas (forrageiras).

Os dados de sequenciamento nos apontaram, ainda, uma elevada expressão do gene *very low-density lipoprotein receptor-like* (XP_001122285.3) na condição DNP comparada à DP. Seu ortólogo em humanos (NM_001018056.1) codifica um receptor de lipoproteínas de muito baixo peso molecular (Nakajima et al., 2011). Insetos não possuem colesterol, de tal forma que a via do mevalonato é metabolicamente desviada para a produção de hormônio juvenil (HJ) (Bellés et al., 2005). Referente ao gene XP_001122285.3 podemos especular que, em *A. mellifera*, a sua expressão esteja associada a títulos elevados de HJ, podendo agir como um receptor do transportador desse hormônio. Caso tal especulação esteja correta, a expressão de tal gene também estaria então associada ao *status* de forrageiras, cujos títulos de HJ são mais elevados do que os de nutridoras (Fluri et al., 1982).

Ainda em resposta à condição DNP, destacaram-se na análise de *Gene Ontology* termos relacionados à orientação de axônios e desenvolvimento de projeções neuronais, categorias que incluem os seguintes ortólogos em *A. mellifera*: *venus kinase receptor* (XM_397038.5); *syndecan* (XM_396998); *activin like protein at 23B-like protein* (XM_001122210.3); *hypothetical LOC100576993* (XR_119711.1, ortólogo do CG1322 de *D. melanogaster*, um dos *hubs* da rede de interação proteína-proteína); *hypothetical LOC100577287* (XR_120626.1); *hypothetical LOC100577315* (XR_120627.1). Até onde sabemos, é a primeira vez que um trabalho reporta tais termos enriquecidos em corpos gordurosos de operárias jovens que consumiram uma dieta similar a de uma forrageira.

Como revisado por Zayed e Robinson (2012), uma grande quantidade de trabalhos revelaram um aumento na demanda cognitiva relacionada à memória e ao aprendizado no cérebro de forrageiras quando comparadas ao cérebro de nutridoras. Com o envelhecimento natural, as operárias que transitam das atividades intra-nidais para as tarefas de forrageamento aumentam a capacidade cognitiva no tocante a

memória e aprendizado necessários para realizar a navegação espacial durante o voo, identificar a localização da fonte de alimento em relação à colméia e passar essas informações para as outras forrageiras (Whitfield et al., 2006). O início da fase de forrageamento é, portanto, marcado por uma plasticidade neuronal, especialmente nos *mushroom bodies*, estruturas cerebrais ligadas ao aprendizado e memória olfatória e visual (Whiters et al., 1993). Sugere-se que a neurogênese não ocorre no cérebro de operárias adultas (Fahrbach et al., 1995), o que não descarta o estabelecimento de novas projeções neuronais. Essas projeções, pivotantes para o aprendizado ligado ao forrageamento (Coss et al., 1980; Brandon & Coss, 1982; Whiters et al., 1993), potencialmente inervam o corpo gorduroso (local onde os genes acima foram detectados), conectando, mais uma vez, a atividade dos dois tecidos. Nossos resultados apontam, dessa forma, para um perfil neuronal plástico nas operárias criadas na dieta livre de proteínas. Tal característica, típica de forrageiras ainda jovens, nos sugere uma progressão antecipada do envelhecimento nas operárias do grupo DNP.

Estudos recentes apontaram uma comunicação entre o cérebro (mais precisamente neurônios hipotalâmicos) e o tecido adiposo em camundongos (Dodd et al., 2015). Tais neurônios interagem diretamente com os hormônios insulina e leptina, controlando o balanço energético do tecido adiposo e, conseqüentemente, a fome ou a saciedade (Dodd et al., 2015). Paralelamente, alguns neurônios octopaminérgicos de insetos estão envolvidos na transmissão de sinais nutricionais de órgãos periféricos, como o corpo gorduroso, para o cérebro (Roeder, 1999). Em nosso trabalho, os padrões transcricionais relacionados à orientação de axônios e desenvolvimento de projeções neuronais podem ser o resultado de uma expressão sinérgica entre o corpo gorduroso e o cérebro. Vale lembrar que o corpo gorduroso dos insetos é um órgão sensor de nutrientes análogo ao fígado e tecido adiposo dos vertebrados (Azeez et al., 2014). Certamente mais investigações serão necessárias para entender a prevalência desses processos biológicos em resposta à condição DNP, revelados no transcriptoma do corpo gorduroso.

Nossos resultados de sequenciamento do corpo gorduroso não apontaram a expressão diferencial de nenhum dos dois peptídeos do tipo insulina presentes em *A. mellifera*, Amilp1 e Amilp2 (Nilsen et al., 2011), frente às duas condições alimentares. Enquanto Amilp1 é mais relacionado à via da insulina e ao comportamento de forrageamento, sendo superexpresso nessa fase (Ament et al., 2008), Amilp2 é associado ao comportamento de nutriz (Nilsen et al., 2011). Ainda não há completa

clareza do papel desses peptídeos em *A. mellifera* (Nilsen et al., 2011), de maneira que há na literatura dados contrastantes sobre a expressão desses genes. Por exemplo, Ihle et al. (2014) não encontraram, em corpos gordurosos de operárias criadas em gaiolas por seis dias, diferença na expressão de Amilp1 e Amilp2, quando submetidas à dieta rica em proteínas (30% de solução de aminoácidos, 10% de sacarose e 1% de lipídeos) versus uma dieta rica em carboidratos (50% sacarose e 2% de solução de aminoácidos). Alaux et al. (2011), por sua vez, encontraram que operárias criadas em gaiolas por oito dias em dieta de candy (carboidratos) suplementada com pólen superexpressam Amilp2 em relação a operárias alimentadas exclusivamente com candy. No trabalho de Alaux et al. (2011), contudo, diferentemente de outros trabalhos, as operárias tiveram contato com o feromônio mandibular da rainha (QMP), o qual estimula as operárias a se comportem como nutridoras (Pankiw et al., 1998; Fischer & Grozinger, 2008). Uma vez que os peptídeos Amilp1 e Amilp2 desempenham papel na regulação da divisão do trabalho em operárias *A. mellifera* (Ament et al., 2008; Wang et al., 2009), além do sensorimento nutricional (Nilsen et al., 2011), acreditamos que em nosso trabalho a ausência de diferença na expressão de Amilp1 e Amilp2, entre as duas condições nutricionais, se deva ao fato das operárias em gaiolas não poderem desempenhar todos os comportamentos típicos da vida social nas colônias e, também, pois o confinamento experimental as colocam em condição de orfandade, portanto sem contato com pistas ambientais como o QMP produzido pelas rainhas.

No tocante ao sequenciamento das bibliotecas de RNAs curtos, 183 miRNAs se expressaram em corpos gordurosos de abelhas operárias de sete dias de vida, independente da condição alimentar a que as abelhas foram submetidas. Esse número corresponde à expressão de cerca de 82% dos 222 miRNAs conhecidos e depositados na base de dados miRBase (v. 19), sugerindo a ocorrência de mecanismos de regulação gênica muito finos e precisos no tecido analisado. Três miRNAs sofreram influência da dieta: miR-31a, miR-100 e miR-125, sendo mais expressos na condição DNP comparada à DP, dados também validados por RT-qPCR. Esse resultado indica que poucos miRNAs tem seu perfil transcricional modificado em abelhas operárias adultas de mesma idade em função do consumo de dietas distintas.

Liu et al. (2012) mostraram, por sequenciamento em larga escala, que apenas nove miRNAs são diferencialmente expressos entre cabeças de operárias nutridoras e forrageiras *A. mellifera* vivendo sob condições naturais. Nunes et al. (2013) estudando os efeitos do silenciamento de Vg (via *RNA interference*, RNAi) em operárias

forrageiras com 15 dias encontraram que apenas sete miRNAs sofreram modulação da expressão em corpos gordurosos e seis em cérebros. Dentre os miRNAs diferencialmente modulados em cérebros, miR-31a teve um aumento de sua expressão em função do silenciamento de Vg (Nunes et al., 2013). No presente trabalho, observamos que a expressão de miR-31a foi maior no corpo gorduroso de operárias do grupo DNP, condição em que a Vg apresentou uma baixa expressão frente à condição DP. Tudo isso nos sugere que o miR-31a responde a quedas dos níveis de Vg, sejam elas naturais (que ocorrem durante a progressão da vida adulta) ou experimentalmente induzidas por RNAi ou por dietas não-proteicas. Discrepâncias a parte no que se refere aos órgãos analisados e idade das abelhas, mencionados acima, não podemos ignorar que haja alguma conexão entre miR-31a, Vg e envelhecimento, a qual necessitará mais estudos.

Os miRNAs miR-100 e miR-125 formam, em *D. melanogaster*, juntamente com miRNA let-7, um cluster gênico (*in tandem*) que coordena as mudas larvais e metamórfica, sendo assim reguladores do tempo de desenvolvimento (Bashirullah et al., 2003; Sempere et al., 2003; Asgari, 2013). Assim como para o miR-31a, até onde sabemos, não há qualquer relato na literatura mostrando que miR-100 e miR-125 sejam superexpressos em resposta ao consumo de dietas livres de proteínas, sendo essa a primeira vez que tal relação é proposta.

De modo geral, os resultados do sequenciamento em larga escala nos mostraram, por uma perspectiva baseada no transcriptoma do corpo gorduroso, que a ingestão de uma dieta não proteica foi capaz de induzir um envelhecimento precoce em abelhas de apenas sete dias de vida adulta, apresentando fenótipos moleculares semelhantes aos de forrageiras. Por outro lado, uma dieta baseada em pólen (rica em proteínas, além de outros nutrientes) induziu um perfil transcricional semelhante ao de nutridoras.

5.4. Análise da expressão gênica pontual fornece indícios de atividades coordenadas entre o cérebro e o corpo gorduroso

Em nosso trabalho, os dados de sequenciamento em larga escala foram experimentalmente validados por RT-qPCR. Os transcritos dos genes: Vg, JHE, XP_624408.2 e XP_393528.3 mostraram-se mais abundantes em corpos gordurosos de operárias criadas sob a condição DP do que sob a condição DNP. Por sua vez, os transcritos dos genes: XP_06561863.1, miR-100, miR-125 e miR-31a foram mais

expressos em corpos gordurosos de abelhas criadas sob a condição DNP se comparada à condição DP.

Como mencionado anteriormente, a transição para o forrageamento é acompanhada pelo aumento nos títulos de HJ e diminuição nos níveis de Vg (Fluri et al., 1982), o que desencadeia alterações transcricionais e ao nível proteico tanto no cérebro (Whitfield et al., 2003; Brockman et al., 2009; Zayed et al., 2011) quanto no corpo gorduroso (Corona et al., 2007; Martins et al., 2010; Ament et al., 2011; Chan et al., 2011), resultando em mudanças morfológicas e metabólicas (Fluri et al., 1982; Crailsheim, 1986; Huang et al., 1994; Toth & Robinson, 2005; Wolschin & Amdam, 2007). Ao interpretarmos os dados de diferentes estudos, observamos fortes indícios da existência de um potencial circuito biológico integrado entre cérebro e corpo gorduroso capaz de coordenar os diferentes aspectos do comportamento social, como a transição para o forrageamento (Toth et al., 2005; Corona et al., 2007; Ament et al., 2008; Wang et al., 2010; Amdam & Page, 2010; Ament et al., 2011; Nilsen et al., 2011; Wang et al., 2012; Nunes et al., 2013).

Buscando outras evidências que suportem nossa convicção sobre a existência do circuito biológico integrado entre cérebro e corpo gorduroso, analisamos na cabeça a expressão dos mesmos genes validados em corpo gorduroso. Quatro genes apresentaram o mesmo perfil de expressão em todas as condições nutricionais e tecidos testados: Hex70a, Vg e XP_624408.2 foram superexpressos na condição DP se comparada à condição DNP; e o gene XP_006561863.1 na condição DNP quando comparada a condição DP. Foi a primeira vez que, ao nível transcricional, se demonstrou esse tipo de relação em abelhas. No entanto, transcritos de miR-31a, miR-100 e miR-125, Hex110, JHE e XP_393528.3, cujas expressões no corpo gorduroso responderam ao *status* nutricional, não se mostraram nutricionalmente-dependentes no cérebro, sendo também a primeira vez que tal efeito, espaço-específico, é demonstrado.

Hexamerinas são proteínas primariamente sintetizadas no corpo gorduroso larval, atuam no estoque energético acumulando aminoácidos para suportar o desenvolvimento do organismo, além de apresentarem possíveis papéis na formação da cutícula e na resposta imune (Burmester, 1999). Em *A. mellifera*, sabe-se que a abundância de transcritos de Hex70a e Hex110, no corpo gorduro de operárias, é dependente do consumo de proteínas (pólen) (Bitondi et al., 2006; Martins et al., 2008) no início da vida adulta, momento em que os títulos de HJ são baixos. Há, no entanto, evidências do envolvimento das hexamerinas Hex 70a e Hex 110 como potenciais

ligantes de Hormônio Juvenil (Martins et al., 2010). Isto sugere uma regulação negativa, talvez envolvida com a remoção de HJ circulante na hemolinfa. Além disso, é a primeira vez que se observa mRNAs de Hex70a e Hex110 com expressão diferencial no cérebro de operárias de mesma idade em resposta à dietas distintas. Tal resultado aponta para papéis ainda não explorados dessas proteínas no sistema nervoso de insetos.

A proteína Vg, precursora do vitelo do ovo (Postlethwait & Giorgi, 1985) está envolvida em funções como controle hormonal e comportamento alimentar (Guidugli et al., 2005; Nelson et al., 2007), além de atuar na resistência ao estresse oxidativo e longevidade (Amdam et al., 2004; Seehuus et al., 2006; Münch et al., 2008). Vg apresenta um papel na regulação da transição comportamental de operárias, apresentando altos níveis em nutridoras e baixos níveis em forrageiras (Page & Amdam, 2007). A transição para o forrageamento em *A. mellifera* requer níveis crescentes de HJ (Hartfelder & Engels, 1998). Um estudo de silenciamento da Vg provou que esta proteína e o HJ atuam em retromodulação (Guidugli et al., 2005). Em nosso estudo, os perfis transcricional de Vg no corpo gorduroso e na cabeça responderam da mesma forma frente às condições DP e DNP. O mesmo não foi observado para o perfil transcricional da Esterase do Hormônio Juvenil (JHE), que apresentou diferença de expressão nos corpos gordurosos em função das dietas (mais expressa em DP do que em DNP), mas não na cabeça. A JHE é uma enzima responsável pela degradação do HJ (Hammock 1985; Campbell et al., 1998; Mackert et al., 2008). Esse dado, mais uma vez, reforça que a DNP induz um envelhecimento precoce, uma vez que os títulos de HJ são mais altos em operárias mais velhas (forrageiras), momento em que se observa uma redução nos níveis de transcritos de JHE no corpo gorduroso (Mackert et al., 2008). No que se refere à JHE na cabeça, sugere-se que sua expressão independa de sinais nutricionais e, ainda, que os mecanismos de regulação desse gene obedeçam a regras tecido-específicas.

Sobre os genes codificadores das proteínas *trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase-like* (XP_624408.2) e *glyoxylate reductase/ hydroxypyruvate reductase-like* (XP_393528.3, um dos *hubs* da rede de interações proteína-proteína, CG9331), seus ortólogos em *D. melanogaster* (CG3609 e CG9331, respectivamente) codificam proteínas que apresentam atividade oxidoreductase. Oxidoreductases formam uma classe de enzimas conservadas filogeneticamente que catalisam a transferência de elétrons entre substratos e são fundamentais para processos respiratórios e a manutenção do *status* oxidativo (Watkins et al., 2014). A menor expressão do gene XP_624408.2 em

cabeças e corpos gordurosos de operárias do grupo DNP, em relação ao grupo DP, indica uma deficiência na manutenção do *status* oxidativo nesses indivíduos.

O gene codificador da proteínas *beta-hexosaminidase subunit beta-like* (XP_006561863.1) é ortólogo da Hexoaminidase 2 de moscas que, por sua vez, codifica uma enzima com atividade glicosídeo hidrolase. Hexoaminidases são responsáveis pela remoção das marcações N-glicosídicas de glicoproteínas, um passo fundamental para seu reconhecimento, dobramento e degradação. Mutações nestas enzimas são relacionadas a defeitos no sistema nervoso, asas e olhos de *D. melanogaster* (Rosenbaum et al., 2014) e a síndrome de Tay-Sachs em humanos (Pierson et al., 2013). É possível supor que a dieta baseada exclusivamente em carboidratos (DNP) tenha resultado na atividade diferencial do XP_006561863.1, o que poderia ainda alterar o padrão de glicosilação das proteínas. Até onde sabemos, é a primeira vez que um trabalho reporta uma atividade diferencial de uma hexoaminidase em resposta a condições dietéticas distintas.

Dos três genes mencionados nos dois últimos parágrafos (XP_624408.2, XP_393528.3 e XP_006561863.1), apenas o XP_393528.3 não apresentou perfis transcricionais similares em cabeças e corpos gordurosos frente às condições DNP e DP (mensurados por RT-qPCR). Ainda assim, a expressão diferencial observada em corpos gordurosos de *A. mellifera* nos permite apontar que esses três genes são marcadores do *status* nutricional e também são fortes candidatos a marcadores da progressão do desenvolvimento.

5.5. A perturbação do transcriptoma do corpo gorduroso pela dieta sem proteínas se reflete nas predições das redes de interação proteína-proteína

Para melhor compreender como as diferentes dietas influenciaram os perfis transcricionais do corpo gorduroso, foram geradas redes baseadas em interações proteína-proteína, bem estabelecidas para *D. melanogaster*, organismo modelo cujos dados genômicos são os mais conhecidos e bem anotados dentre os insetos, servindo assim como referência. Para tanto, assumimos que a expressão de um dado mRNA equivale a presença de sua respectiva proteína na célula, independentemente da quantidade de transcritos. Os resultados indicaram que a DNP impactou negativamente o transcriptoma dos corpos gordurosos de operárias jovens quando se compara à condição DP. Muitos genes que naturalmente estariam expressos em operárias de sete dias de vida, deixam de se expressar ou se expressam menos na condição DNP do que

na condição DP. Como reflexo disso, a rede de interações gerada para o grupo DNP apresentou menos dados, menos conexões e, portanto, menor complexidade.

O número ligeiramente maior de ortólogos encontrados em *D. melanogaster* para o grupo de dados de operárias criadas sob a condição DP (140 dos 197 genes, 71%), em contraste com os encontrados para a condição DNP (90 dos 139 genes, 65%) não serve de razão para explicar a maior complexidade da rede DP. Acreditamos que a rede de interação proteína-proteína da condição DP seja mais complexa e bem interconectada por refletir o melhor aproveitamento energético do pólen, dieta para a qual a fisiologia das operárias está preparada para lidar nesta fase da vida (Ament et al., 2011). Por sua vez, a condição DNP seria inadequada para o início da vida adulta, de tal forma que interpretamos suas consequências sobre o transcriptoma do corpo gorduroso como perturbações.

5.6. Operárias alimentadas com uma dieta livre de proteínas (DNP) apresentam maior acúmulo de dano oxidativo aos sete dias de vida adulta

O estabelecimento do estresse oxidativo é altamente prejudicial ao organismo (Sorg, 2004; Leonarduzzi et al., 2010; Carochi & Ferreira, 2013; Martelli & Nunes, 2014) e fortemente relacionada ao envelhecimento (Fransen et al., 2012). Um dos danos mais tóxicos que as EROs podem causar ao organismo é a peroxidação dos lipídeos, o que dismantela a fluidez das membranas plasmáticas podendo ocasionar lesões a proteínas e ácidos nucleicos (Magder, 2006), interferindo na transdução de sinais, na atividade de receptores e enzimas (Magder, 2006; Leonarduzzi et al., 2010) e no funcionamento do genoma (Houtgraaf et al., 2006; Svilar et al., 2010).

O malondialdeído (MDA), quantificado nesse trabalho, é um dos principais produtos da peroxidação de lipídeos (Esterbauer et al., 1991; Onyango & Baba, 2010), amplamente utilizado como um biomarcador do estresse oxidativo (Esterbauer et al., 1991; Onyango & Baba, 2010). Alguns trabalhos têm avaliado o acúmulo de MDA em insetos como no ortóptero *Oxya chinensis* (Zhang et al., 2011) e no hemíptero *Oncopeltus fasciatus* (Cervera et al., 2003), em vertebrados (Oropesa et al., 2009; Kobo et al., 2014) e até mesmo em plantas (Wei et al., 2007).

Uma dieta excessivamente calórica é uma conhecida fonte externa que pode desencadear o estresse oxidativo (Carochi & Ferreira, 2013). Dentre as condições alimentares utilizadas nesse trabalho, a dieta com pólen (DP) foi a potencialmente mais calórica, devido à presença de proteínas, lipídeos, além do açúcar, esse último também

presente na condição DNP. Ainda assim, tal dieta gerou menos dano oxidativo que a condição DNP em corpos gordurosos. Como abordado no item 5.3, operárias da condição DP superexpressaram as glutatona S-transferase GstU1 e GstS1, mostrando indícios de uma melhor defesa antioxidante, algo não observado em operárias da condição DNP. As glutatona-s-transferases utilizam as moléculas de glutatona reduzida, que é oxidada no processo, para promover a detoxificação de vários compostos, como por exemplo, os lipídeos peroxidados (Oakley, 2011). Acreditamos que uma defesa antioxidante menos eficiente ocasionada pela condição DNP, somada a variabilidade genética naturalmente presente no grupo de operárias, reflitam nos resultados que observamos. É possível que na condição DNP, o intervalo inferior de valores de danos em corpos gordurosos (vide **Figura 13**) seja ocupado por operárias (~ 65% dos indivíduos) que toleram um limiar de dano, a partir do qual o acúmulo de estresse oxidativo torna-se desenfreado, resultando em indivíduos que apresentaram elevado acúmulo de estresse (~ 35% dos indivíduos).

O menor acúmulo de MDA em corpos gordurosos de operárias alimentadas sobre a condição DP pode estar relacionado a diversos fatores diretamente relacionados à dieta. O pólen é um alimento com propriedades antioxidantes (Fatrcová-Sramková et al., 2013; Pascoal et al., 2014), o que provavelmente se deve a presença de ácidos fenólicos (Almeida-Muradian et al., 2005; Leja et al., 2007), compostos ubíquos em plantas que atuam eliminando EROs (Krishnaiah et al., 2011; Caroch & Ferreira, 2013). O pólen pode, portanto, ter auxiliado na proteção contra o estresse oxidativo das operárias da condição DP. Como mencionado anteriormente, em condições naturais, a Vg se expressa mais em operárias jovens do que em velhas. Também é sabido que a proteína Vg auxilia na resistência ao estresse oxidativo, atuando como alvo de carbonilação oxidativa (Seehus et al., 2006), o que reduz a ocorrência de danos oxidativos a outros componentes celulares, tais como os lipídeos de membrana. Uma vez que as operárias da condição DP apresentaram elevados níveis de transcritos de Vg (provavelmente refletindo em seus níveis proteicos), tais operárias provavelmente contaram com mais essa defesa contra o estresse oxidativo.

Podemos ressaltar ainda que as operárias da condição DNP provavelmente apresentaram um menor estoque de lipídeos abdominais que operárias da condição DP, devido à ausência de pólen em suas dietas. Pelos mesmos motivos, as operárias forrageiras sofrem a perda controlada de 50% dos estoques de lipídeos abdominais ao iniciaram a dieta exclusiva de carboidratos (Toth & Robinson, 2005). Ou seja, mesmo

possuindo menos substrato para o processo de peroxidação lipídica, as operárias do grupo DNP apresentaram maior acúmulo de MDA.

O acúmulo de marcadores de estresse oxidativo na cabeça foi menor que em corpos gordurosos e não variou entre as condições alimentares. Também não encontramos correlação entre o acúmulo de MDA em cabeças e corpos gordurosos, indicando que o dano oxidativo ocorreu de forma independente nesses dois órgãos. Tal resultado pode indicar que a proteção contra o estresse oxidativo é mais eficiente em cérebros do que em corpos gordurosos. Isso pode ocorrer devido à necessidade de se proteger o cérebro, por ser um órgão vital à navegação, comportamento social, aprendizado e funcionamento de todo o organismo (Winston, 1987; Menzel & Muller, 1996; Robinson et al., 1997; Garcia et al., 2009), ou ainda pela maior proximidade do corpo gorduroso ao intestino, local inclinado à formação de espécies reativas e dano oxidativo devido ao acúmulo de nutrientes e metabolismo da microbiota (Circu & Aw, 2012). Interessantemente, e em acordo com nossos achados, Willians et al. (2008) avaliando o nível de proteínas carboniladas, também um marcador de estresse oxidativo, não encontrou diferenças quando analisou cabeças de nutridoras e forrageiras *A. mellifera*.

De forma geral, enquanto cabeças em ambas as condições apresentaram baixo dano oxidativo, do ponto de vista do corpo gorduroso a condição DNP foi a que causou, em média, o maior dano oxidativo. O que nos fornece mais uma evidência de que uma dieta livre de pólen é capaz de desencadear fenótipos relacionados ao envelhecimento. Podemos enfatizar ainda que o estresse oxidativo elevado observado em uma parcela das operárias criadas na condição DNP não foi devido ao excesso de açúcar na alimentação, uma vez que ambas as dietas fornecidas têm grande quantidade de açúcares. O dano ocorreu muito mais em função da carência de pólen na dieta e da consequente fisiologia alterada nas operárias de mesma idade. Até onde sabemos, é a primeira vez que um estudo avalia o acúmulo de marcadores de estresse oxidativo em cérebros e corpos gordurosos de operárias *A. mellifera* submetidas a duas condições alimentares distintas.

5.7. Dieta livre de proteínas perturba o perfil de CHC

Ferreira-Caliman et al. (2010) mostraram que na abelha *Melipona marginata* a proporção de n-alcanos é maior em forrageiras que em nutridoras e o oposto é encontrado para alcenos e alcadienos. Trabalhos com *A. mellifera* encontraram uma

maior abundância de n-alcanos e menor abundância de alcenos em operárias forrageiras do que em nutridoras (Kather, 2011) e recém-emergidas (Falcón et al., 2014). Em nosso trabalho, operárias do grupo DP apresentaram uma maior proporção de alcenos (45,33% em DP *versus* 29,68% em DNP) e alcadienos (7,92% em DP *versus* 5,94% em DNP). Entretanto, operárias do grupo DNP apresentaram uma maior proporção de n-alcanos (49,59% em DNP *versus* 37,02% em DP) e metil-alcanos (12,53% em DNP *versus* 7,41% em DP).

Com base na literatura (Ferreira-Caliman et al., 2010; Falcón et al., 2014; Kather, 2011) nossos dados nos permitem afirmar que, do ponto de vista do perfil de CHC, a condição DNP tornou operárias de sete dias mais próximas de forrageiras e a condição DP tornou operárias mais próximas de nutridoras. Por estar relacionado à alimentação (Howard & Blomquist, 2005; Makki et al., 2014) e poder servir como indicador do *status* nutricional, além de marcador de envelhecimento (Brei et al., 2004; Roux et al., 2008; Moore et al., 2013; Xu et al., 2014), o perfil de CHC em nosso trabalho nos indica não apenas os efeitos da dieta sobre a síntese de CHC, mas aponta para o envelhecimento fisiológico e molecular de nosso modelo de estudo quando submetido a uma condição nutricional livre de proteínas (DNP) e manutenção de seu *status* jovem quando submetido a uma condição nutricional rica em proteínas (DP).

5.8. Considerações finais

A transição comportamental em operárias *A. mellifera* é um processo plástico e pode ser modulado em função de mecanismos ambientais como a dieta (Keller et al., 2005; Toth & Robinson, 2005; Toth et al., 2005; Chan et al., 2011), de forma que o envelhecimento cronológico pode ser desacoplado do fisiológico (Behrends et al., 2007).

Em nosso trabalho, operárias recém-emergidas criadas por sete dias sob uma dieta composta por pólen e, também, carboidratos (DP), que mimetiza a dieta de uma nutridora (Winston, 1987; Crailsheim et al., 1992), apresentaram um maior grau de ativação das glândulas hipofaríngeas e uma análise funcional dos perfis transcricionais evidenciou a ativação de vias metabólicas de proteínas, lipídeos e carboidratos bem como uma resposta imunológica eficiente. Estas operárias também mostraram menor acúmulo de estresse oxidativo no corpo gorduroso, maior sobrevivência e uma maior proporção de alcenos e alcadienos nos perfis de hidrocarbonetos cuticulares em relação às operárias do grupo DNP. Todas essas

características nos permitem afirmar que as abelhas do grupo DP apresentam fenótipos semelhantes aos de nutridoras, o que é esperado para uma operária de sete dias de vida.

Por sua vez, operárias recém-emergidas criadas por sete dias sob uma dieta elaborada exclusivamente com carboidratos (DNP), que mimetiza a dieta de uma forrageira (Winston, 1987; Crailsheim et al., 1992), apresentaram um menor grau de ativação das glândulas hipofaringeanas e uma análise funcional dos perfis transcricionais evidenciou a ativação de mecanismos relacionadas à diferenciação celular e neural, migração celular, desenvolvimento celular e de tecidos e resposta a estímulos. Pelo menos parte dessas operárias apresentou maior acúmulo de estresse oxidativo no corpo gorduroso, além de apresentarem menor sobrevivência e maior proporção de n-alcenos e metil-alcenos nos perfis de hidrocarbonetos cuticulares que abelhas do grupo DP. Todas essas características nos permitem afirmar que as abelhas do grupo DNP apresentam fenótipos similares aos de forrageiras, o que não é esperado para uma operária de sete dias de vida.

Além disso, detectamos elementos genéticos não-clássicos como diferencialmente modulados em função das dietas distintas, tais como: Pepck, XP_624408.2, XP_393528.3, XP_006561863.1, miR-100, miR-125 e miR-31a. Esses elementos podem, talvez, estar relacionados a genes clássicos das vias IIS e TOR. Também em nosso trabalho, apresentamos evidências por RT-qPCR e sequenciamento em larga escala que suportam a existência do circuito biológico integrado entre corpo gorduroso e cérebro. Acreditamos que esse circuito seja responsável por controlar muitos dos aspectos relacionados à progressão do desenvolvimento, tal como a transição comportamental nesse organismo e, consequentemente, a longevidade. Sendo assim, a perturbação desse circuito mediada por fatores externos (como a dieta) ou internos (como a expressão desregulada de genes) podem acarretar em envelhecimento precoce.

A análise funcional dos resultados do sequenciamento de corpo gorduroso apontaram termos ligados à plasticidade do sistema nervoso frente à condição DNP. Esse resultado, como os demais, indica uma antecipação do desenvolvimento, já que está é uma característica de jovens forrageiras. As operárias de sete dias de vida não apresentaram, dentro dos parâmetros analisados, sinais de falência precoce de órgãos induzida pela condição DNP, o que poderia ser outra *causa mortis*. Ao contrário, as operárias do grupo DNP apresentaram o funcionamento fisiológico normal de uma jovem abelha forrageira, um indivíduo fisiologicamente mais velho, embora nesse caso, tais operárias possuíssem cronologicamente a mesma idade que operárias do grupo DP.

Todos os nossos resultados, portanto, corroboram nossa hipótese inicial de que uma dieta livre de proteínas reduz a longevidade de operárias porque causa uma antecipação de seu envelhecimento.

- ❖ Dieta sem proteínas reduz a longevidade, mantém inativas as glândulas hipofaríngeas e perturba o perfil de CHC de operárias.
- ❖ Dieta rica em proteínas induz a expressão de genes ligados ao metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos e regulação do sistema imunológico, os quais são processos comuns em operárias jovens, como as nutridoras. Enquanto isso, dieta sem proteínas induz a expressão de genes ligados à resposta a estímulos, desenvolvimento celular e neural, migração celular e crescimento celular, os quais são processos que predominam em operárias mais velhas, como as forrageiras.
- ❖ A expressão de poucos miRNAs se altera em função de dietas, sejam elas proteicas ou não-proteicas.
- ❖ Dieta sem proteínas impacta negativamente sobre o interactoma de operárias jovens, as quais apresentam redes de interação proteína-proteína menos complexas do que operárias de mesma idade que consumiram dieta contendo proteínas.
- ❖ Juntos, os elementos genéticos codificadores de XP_624408.2, XP_393528.3 XP_006561863.1 e dos órtólogos de abelhas para os *hubs* CG9986, CG6058, CG2852, CG32031, CG5848 e CG9331, CG11138, CG10160, CG2674, CG5178, CG15884 e CG1322, além dos microRNAs miR-100, miR-125 e miR-31a, são indicados como novos marcadores do *status* nutricional bem como da progressão do desenvolvimento em operárias de *A. mellifera*.
- ❖ Dieta sem proteínas induz maior acúmulo de dano oxidativo no corpo gorduro do que dietas ricas em proteínas.
- ❖ Os resultados sustentam a existência de um circuito biológico integrado entre cabeça e corpo gorduroso que regula os diferentes aspectos do controle da longevidade e do comportamento social em abelhas.
- ❖ De forma geral nossos dados apontaram que operárias jovens, de sete dias, ao se alimentarem de uma dieta livre de proteínas, tem o seu envelhecimento antecipado, tornando-se similares a operárias mais velhas. Esse resultado adiciona novas informações para o entendimento da modulação da idade em insetos sociais, além de enriquecer os conhecimentos sobre este modelo biológico, abrindo novos caminhos para investigação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accili, D. & Arden, K.C. 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 117(4): 421-426.
- Aitchison, J. 1982. The statistical analysis of compositional data. *Journal of the Royal Statistical Society B*. 44: 139-177.
- Alaux, C.; Dantec, C.; Parrinello, H. & Le Conte, Y. 2011. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*. 12: 496.
- Almeida-Muradian, L.B.; Pamplona, L.C.; Coimbra, S. & Barth, O. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee-pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18: 105-111.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Amdam, G.V. & Omhold, S.W. 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*. 223 (4): 451-464.
- Amdam, G.V. & Page, R.E.Jr. 2005. Intergenerational transfers may have decoupled physiological and chronological age in a eusocial insect. *Ageing Research Review*. 4(3): 398-408.
- Amdam, G.V. & Page, R.E.Jr. 2010. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. *Animal Behavior*. 79(5): 973-980.
- Amdam, G.V.; Aase, A.L.T.O.; Seehuus, S.C.; Fondrk, M.K.; Norberg, K. & Hartfelder, K. 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*. 40(12): 939-947.
- Amdam, G.V.; Simões, Z.L.P.; Hagen, A.; Norberg, K.; Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. & Omholt, S. W. 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontol*. 39: 767-773.
- Ament, S.A.; Chan, Q.W.; Wheeler, M.M.; Nixon, S.E.; Johnson, S.P.; Rodriguez-Zas, S.L.; Foster, J.L. & Robinson, G.E. 2011. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *The Journal of Experimental Biology*. 214: 3808-3821.
- Ament, S.A.; Corona, M.; Pollock, H.S. & Robinson, G.E. 2008. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 105(11): 4226-4231.
- Ament, S.A.; Wang, Y. & Robinson, G.E. 2010. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2(5): 566-576.
- Anderson, K.E.; Sheehan, T.H.; Eckholm, B.J.; Mott, B.M. & DeGrandi-Hoffman, G. 2011. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insect Society*. 58(4): 431-444.
- Antúnez, K.; Martín-Hernández, R.; Prieto, L.; Meana, A.; Zunino, P. & Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*. 11(9):2284-2290.
- Asgari, S. 2013. MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 43: 388-397.
- Audic, S. & Claverie, J.M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*. 7(10): 986-995.
- Azeez, O.I.; Meintjes, R. & Chamunorwa, J.P. 2014. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids Health*. 13: 71.

- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136 (2): 215-233.
- Bashirullah, A.; Pasquinelli, A.E.; Kiger, A.A.; Perrimon, N.; Ruvkun, G. & Thummel, C.S. 2003. Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology*. 259(1): 1-8.
- Behrends, A.; Scheiner, R.; Baker, N. & Amdam, G.V. 2007. Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental Gerontology*. 42: 1146-1153.
- Bellés, X.; Martín, D. & Piulachs, M.D. 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annual Review of Entomology*. 50:181-199.
- Ben-Shahar, Y.; Dudek, N.L. & Robinson, G.E. 2004. Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter malvolio in honey bee division of labor. *Journal of Experimental Biology*. 207(19): 3281-3288.
- Bitondi, M.M.G.; Nascimento, A.M.; Cunha, A.D.; Guidugli, K.R.; Nunes, F.M.F. & Simões, Z.L.P. 2006. Characterization and Expression of the Hex 110 Gene Encoding a Glutamine-Rich Hexamerin in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 63:57-72.
- Brandon, J.G. & Coss, R.G. 1982. Rapid Dendritic Spine Stem Shortening During One-Trial Learning" The Honeybee's First Orientation Flight. *Brain Research*. 252: 51-61.
- Brei, B.; Edman, J.D.; Gerade, B. & Clark, J.M. 2004. Relative abundance of two cuticular hydrocarbons indicates whether a mosquito is old enough to transmit malaria parasites. *Journal of Medical Entomology*. 41(4): 807-809.
- Brockmann, A.; Annangudi, S.P.; Richmond, T.A.; Ament, S.A.; Xie, F.; Southey, B.R.; Rodriguez-Zas, S.R.; Robinson, G.E. & Sweedler, J.V. 2009. Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106: 2383-2388.
- Brodschneider, R. & Crailsheim, K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 41: 278-294.
- Bullard, J.H.; Purdom, E.; Hansen, K.D. & Dudoit, S. 2010. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics*. 11:94.
- Burmester, T. 1999. Evolution and function of the insect hexamerins. *European Journal of Entomology*. 96: 213-225.
- Campbell, P.M.; Oakeshott, J.G. & Healy, M.J. 1998. Purification and kinetic characterisation of juvenile hormone esterase from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 501-515.
- Cantwell, G.E. 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal*. 110: 222-223.
- Carlson, D.A. 1989. Dimethyl disulfide Derivates of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 61: 1564-1571.
- Carocho, M. & Ferreira, I.C.F.R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15 – 25.

- Cervera, A.; Maymó, A.C.; Martínez-Pardo, R. & Garcerá, M.D. 2003. Antioxidant Enzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) Exposed to Cadmium. *Environmental Entomology*. 32(4):705-710.
- Chaimanee, V.; Chantawannakul, P.; Chen, Y.; Evans, J.D. & Pettis, J.S. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*. 58(6): 1090-1095.
- Chan, Q.W.T.; Mutti, N.S.; Foster, L.J.; Kocher, S.D.; Amdam, G.V. & Wolschin, F. 2011. The Worker Honeybee Fat Body Proteome Is Extensively Remodeled Preceding a Major Life-History Transition. *Plos One*. 6(9):e24794.
- Chen, Y.; Evans, J.D.; Smith, I.B. & Pettis, J.S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 186-188.
- Chrysoshoou, C. & Stefanadis, C. 2013. Longevity and Diet. Myth or pragmatism? *Maturitas*. 76: 303-307.
- Circu, M.L. & Aw, T.Y. 2012. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 23: 729-737.
- Conn, C.S. & Qian, S.B. 2013. Nutrient Signaling in Protein Homeostasis: An Increase in Quantity at the Expense of Quality. *Cell Biology*. 6 (271): 1-9.
- Corby-Harris, V.; Jones, B.M.; Walton, A.; Schwan, M.R. & Anderson, K.E. 2014. Transcriptional markers of sub-optimal nutrition in developing *Apis mellifera* nutridora workers. *BMC Genomics*. 15:134.
- Corona, M.; Velarde, R.A.; Remolina, S.; Moran-Lauter, A.; Wang, Y.; Hughes, K.A. & Robinson, G.E. 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 104(17): 7128-7133.
- Coss, R.G.; Brandon, J.G. & Globus, A. 1980. Changes in morphology of dendritic spines on honeybee calycal interneurons associated with cumulative nursing and foraging experiences. *Brain Research*. 192: 49-59.
- Crailsheim, K. & Stolberg, E. 1989. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*. 35(8): 595-602.
- Crailsheim, K. 1986. Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm), *Journal of Insect Physiology*. 32, 629-634.
- Crailsheim, K. 1990. The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*. 21: 417-429.
- Crailsheim, K.; Schneider, L.H.W.; Hrassnigg, N.; Bühlmann, G.; Brosch, U.; Gmeinbauer, R. & Schöffmann, B. 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*. 38: 409-419.
- Dandona, P. & Aljada, A. 2002. A rational approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *American Journal Cardiology*. 90:27-33.
- Dannefer, D. & Daub, A. 2009. Extending the interrogation: Life span, life course, and the constitution of human aging. *Advances in Life Course Research*. 14: 15-27.
- de Groot, A. P. 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Physiologia Comparata et d'Ecologia*. 3: 197-285.

- Dennis, G.; Sherman, B.T.; Hosack, D.A.; Yang, J.; Gao, W.; Lane, H.C. & Lempicki, R.A. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biology*. 4: P3.
- Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L.P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunet, J.L. & Alaux, C. 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PlosOne*. 8(8): e72016.
- Dodd, G.T.; Decherf, S.; Loh, K.; Simonds, S.E.; Wiede, F.; Balland, E.; Merry, T.L.; Münzberg, H.; Zhang, Z.Y.; Kahn, B.B; Neel, B.G.; Bence, K.K.; Andrews, Z.B.; Cowley, M.A. & Tiganis, T. 2015. Leptin and Insulin Act on POMC Neurons to Promote the Browning of White Fat. *Cell*. 160 (1-2): 88-104.
- Edgar, B.A. 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nature Reviews*. 7: 907-916.
- Elsik, C.G. et al. 2014. Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics*. 15: 86.
- Elsik, C.G.; Mackey, A.J.; Reese, J.T.; Milshina, N.V.; Roos, D.S. & Weinstock, G.M. 2007. Creating a honey bee consensus gene set. *Genome Biology* 8(1): R13.
- Esterbauer, H.; Schaur, R.J. & Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 11: 81-128.
- Fahrbach, S.E.; Strande, J.L. & Robinson, G.E. 1995. Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioral neuroplasticity. *Neuroscience Letters*. 197: 145-148.
- Falcón, T.; Ferreira-Caliman, M.J.; Nunes, F.M.F.; Tanaka, E.D.; Nascimento, F.S. & Bitondi, M.M.G. 2014. Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 50: 68-81.
- Farooqui, T. 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International*. 62: 122–136.
- Fatrcová-Sramková, K.; Nôžková, J.; Kacániová, M.; Máriássyová, M.; Rovná, K. & Stricík, M. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health*. 48: 133–138.
- Fernandez, J.; Perez-Halvarez, J.A. & Fernandez-Lopez, J.A. 1996. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59: 345-353.
- Ferreira-Caliman, M.J.; Nascimento, F.S.; Turatti, I.C.; Mateus, S.; Lopes, N.P. & Zucchi, R. 2010. The cuticular hydrocarbons profiles in the stinglessbee *Melipona marginata*. *Journal of Insect Physiology*. 56: 800-804.
- Fischer, P. & Grozinger, C. 2008. Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*. 95: 723-729.
- Flatt, T. & Schmidt, P.S. 2009. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790: 951 –962.
- Flatt, T. 2009. Diet and longevity in the balance. *Nature News and Views*. 462: 989-990.
- Fluri, P.; Lüscher, M.; Wille, H. & Gerig, L. 1982. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honeybees. *Journal of Insect Physiology*. 28: 61-68.
- Footitt, R.G. & Adler, P.H. 2009. *Insect Biodiversity: Science and Society*. Blackwell Publishing Ltd.

- Ford, D. 2013. Honeybees and cell lines as models of DNA methylation and aging in response to diet. *Experimental Gerontology*. 48(7):614-619.
- Fransen, M.; Nordgren, M.; Wang, B. & Apanasets, O. 2012. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822: 1363 – 1373.
- Friedländer, M.R.; Chen, W.; Adamidi, C.; Maaskola, J.; Einspanier, R.; Knespel, S. & Rajewsky N. 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature Biotechnology*. 26(4): 407-415.
- Fries I. 1993. *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World*. 74: 5-19.
- Gallai, N.; Salles, J.M.; Settele, J. & Vassiere, B.E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 58(3): 810-821.
- Garbuzov, A. & Tatar, M. 2010. Hormonal regulation of *Drosophila* microRNA let-7 and miR-125 that target innate immunity. *Fly (Austin)*. 4(4): 306-311.
- Garcia, L.; Saraiva Garcia, C.H.; Calabria, L.K.; Nunes Costa da Cruz, G.; Sanchez Puentes, A.; Bao, S.N.; Fontes, W.; Ricart, C.A.; Salmen Espindola, F. & Valle de Sousa, M. 2009. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. *Journal of Proteome Research*. 8: 1464–1473.
- Guarente, L. & Picard, F. 2005. Calorie Restriction - the SIR2 Connection. *Cell Review*. 120: 473–482.
- Guidugli, K.R.; Nascimento, A.M.; Amdam, G.V.; Barchuk, A.R.; Omholt, S.; Simões, Z.L.P. & Hartfelder, K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*. 579: 4961-4965.
- Hammock, B.D. 1985. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Regulation of juvenile hormone titre: degradation*. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 7. Pergamon, Oxford, 431– 472.
- Hansen, M.; Flatt, T. & Aguilaniu, H. 2013. Reproduction, Fat Metabolism, and Life Span: What Is the Connection? *Cell Metabolism*. 17: 10-19.
- Hartfelder, K. & Engels, W. 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Current Topics in Developmental Biology*. 40, 45–77.
- Haydak, M.H. 1970. Honey bee nutrition. *Annual Review Entomology*. 15, 143–156.
- Hekimi, J.L.; Lapointe, J. & Yang, W. 2011. Taking a “good” look at free radicals in the aging process Siegfried. *Trends in Cell Biology*. 21 (10): 569-576.
- Herrling, T.; Jung, K. & Fuchs, J. 2006. Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica Acta Part A*. 63: 840-845.
- Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Garrido-Bailón, E.; González-Porto, A.V.; Barrios, L.; Del Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Jiménez, J.J.; Palencia, P.G. & Meana, A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*. 10, 2659–2669.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium. 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 443(7114): 931-49.
- Houtgraaf, J.H.; Versmissen, J. & van der Giessen, W.J. 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 7(3): 165 - 172.
- Howard, R.W. & Blomquist, G.J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review Entomology*. 50:371–93.

- Huang, D.W.; Sherman, B.T. & Lempicki, R.A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols*. 4(1): 44-57.
- Huang, Z.Y.; Robinson, G.E. & Borst, D.W. 1994. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees. *Journal of Comparative Physiology*. 174: 731–739.
- Ihle, K.E.; Baker, N.A. & Amdam, G.V. 2014. Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. *Journal of Insect Physiology*. 69:49-55.
- Jewell, J.L.; Russell, R.C. & Guan, K.L. 2013. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature Reviews*. 14: 133-139.
- Junqueira, V.B.C.; Barros, S.B.M.; Chan, S.S.; Rodrigues, L.; Giavarotti, L.; Abud, L.R. & Deucher, G.P. 2004. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*. 25: 5-16.
- Kather, R.; Drijfhout, F.P. & Martin, S.J. 2011. Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology*. 37: 205-212.
- Kato, M. & Slack, F.J. 2012. Ageing and the small, non-coding RNA world. *Ageing Research Reviews*. 12: 429-435.
- Keller, I.; Fluri, P. & Imdorf, A. 2005. Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I. *Bee World*. 86(1):3–10.
- Kim, D. & Salzberg, S.L. 2011. TopHat-Fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biology*. 12:72.
- Klein, A.M.; Vaissiere, B.E.; Cane, J.H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C. & Tscharntke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 274 (1608): 303-313.
- Kobo, P.I.; Ayo, J.O.; Aluwong, T.; Zezi, A.U.; Maikai, V. & Ambali, S.F. 2014. Flavonoid mixture ameliorates increase in erythrocyte osmotic fragility and malondialdehyde concentration induced by *Trypanosoma brucei brucei*-infection in Wistar rats. *Research in Veterinary Science*. 96(1):139-142.
- Krishnaiah, D.; Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. 89: 217 – 233.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 9(4): 357-359.
- Leja, M.; Mareczek, A.; Wyzgolik, G.; Klepacz-Baniak, J. & Czekonska, K. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*. 100: 237-240.
- Leonarduzzi, G.; Sottero, B. & Poli, G. 2010. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. *Pharmacology & Therapeutics*. 128: 336 – 374.
- Lin, Y.; Berg, A.H.; Iyengar, P.; Lam, T.K.; Giacca, A.; Combs, T.P.; Rajala, M.W.; Du, X.; Rollman, B.; Li, W.; Hawkins, M.; Barzilai, N.; Rhodes, C.J.; Fantus, I.G.; Brownlee, M. & Scherer, P.E. 2005. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*. 280:4617–4626.
- Liu, F.; Li, W.; Li, Z.; Zhang, S.; Chen, S. & Su, S. 2011. High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: Comparison between nutridoras and foragers. *Journal of Insect Physiology* 57: 274-279.

- Liu, F.; Peng, W.; Li, Z.; Li, W.; Li, L.; Pan, J.; Zhang, S.; Miao, Y.; Chen, S. & Su, S. 2012. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Insect Molecular Biology*. 21(3): 297-303.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lucanic, M.; Lithgow, G.J. & Alavez, L. 2013. Pharmacological lifespan extension of invertebrates. *Ageing Research Reviews*. 12: 445-458.
- Lynn, F.C. 2009. Meta-regulation: microRNA regulation of glucose and lipid metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20 (9): 452-459.
- Mackert, A.; Nascimento, A.M.; Bitondi, M.M.G.; Hartfelder, K. & Simões, Z.L.P. 2008. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L. - Expression analysis and functional assays. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 150: 33-44.
- Magder, S. 2006. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical Care*. 10: 208 – 216.
- Makki, R.; Cinnamon, E. & Gould, A.P. 2014. The Development and Functions of Oenocytes. *Annual Review of Entomology*. 59: 405-425.
- Martelli, F. & Nunes, F.M.F. 2014. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*. 66(3): 54-57.
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 17(1): 10-12.
- Martins, J.R.; Nunes, F.M.F.; Simões, Z.L.P. & Bitondi, M.M.G. 2008. A honeybee storage protein gene, hex 70a, expressed in developing gonads and nutritionally regulated in adult fat body. *Journal of Insect Physiology*. 54: 867– 877.
- Martins, J.R.; Nunes, F.M.F.; Cristino, A.S.; Simões, Z.L.P. & Bitondi, M.G.M. 2010. The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Molecular Biology*. 11, 23.
- Maurizio, A. 1950. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honeybee. *Bee World*. 31, 9–12.
- Mayack, C. & Naug, D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 100: 185-188.
- Menzel, R. & Muller, U. 1996. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annual Review of Neuroscience*. 19, 379–404.
- Moore, H.E.; Adam, C.D. & Drijfhout, F.P. 2013. Potential use of hydrocarbons for aging *Lucilia sericata* blowfly larvae to establish the postmortem interval. *Journal Forensic Sciences*. 58: 404–412.
- Mortazavi, A.; Williams, B.A.; McCue, K.; Schaeffer, L. & Wold, B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*. 5(7): 621-628.
- Münch, D.; Amdam, G.V. & Wolschin, F. 2008. Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology*. 22(3): 407-421.
- Munoz-Torres, M.C.; Reese, J.T.; Childers, C.P.; Bennett, A.K.; Sundaram, J.P.; Childs, K.L.; Anzola, J.M.; Milshina, N. & Elsik C.G. 2011. Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Research*. 39: 658-662.
- Nakajima, K.; Nakano, T.; Tokita, Y.; Nagamine, T.; Inazu, A.; Kobayashi, J.; Mabuchi, H.; Stanhope, K.L.; Havel, P.J.; Okazaki, M.; Ai, M. & Tanaka, A.

2011. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clinica Chimica Acta*. 412: 1306-1318.
- Naug, D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*. 142: 2369–2372.
- Nelson, C. M.; Ihle, K. E.; Fondrk, M. K.; Page, R. E. & Amdam, G. V. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology*. 5: 62.
- Nilsen, K. A.; Ihle, K. E.; Frederick, K.; Fondrk, M. K.; Smedal, B.; Hartfelder, K. & Amdam, G.V. 2011. Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *The Journal of Experimental Biology*. 214: 1488-1497.
- Nunes, F.M.F.; Ihle, K.E.; Mutti, N.S.; Simões, Z.L.P. & Amdam, G.V. 2013. The gene vitellogenin affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain. *The Journal of Experimental Biology*. 216: 3724-3732.
- Oakley, A. 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*. 43(2): 138 –151.
- Odawara, J.; Harada, A.; Yoshimi, T.; Maehara, K.; Tachibana, T.; Okada, S.; Akashi, K. & Ohkawa Y. 2011. The classification of mRNA expression levels by the phosphorylation state of RNAPII CTD based on a combined genome-wide approach. *BMC Genomics*. 12:516.
- Onyango, A.N. & Baba, N. 2010. New hypotheses on the pathways of formation of malondialdehyde and isofurans. *Free Radical Biology & Medicine*. 49(10):1594-1600.
- Orgad, S.; Nelson, H.; Segal, D. & Nelson, N. 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *Journal of Experimental Biology*. 201(1): 115-120.
- Oropesa, A.L.; García-Camero, J.P. & Soler, F. 2009. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 27(1):30-38.
- Page, R.E. & Amdam, G.V. 2007. The making of a social insect: developmental architectures of social design. *Bioessays*. 29 (4): 334-343.
- Page, R.E. & Peng, CY. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*. 36: 695-711.
- Pankiw, T.; Huang, Z.; Winston, M.L. & Robinson, G.E. 1998. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of Insect Physiology*. 44: 685-692.
- Papaconstantinou, J. 2009. Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 299: 89–100.
- Papadoupoulos, A.I.; Polemitou, I.; Laifi, P.; Yiangou, A. & Tananaki, C. 2004. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST isoenzymes in the adult worker bee. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 139(1-3): 93-97.
- Partridge, L.; Gems, D. & Withers, D.J. 2005. Sex and death: what is the connection? *Cell*. 120: 461-472.
- Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X. & Estevinh, L.M. 2014. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. 63: 233-239.
- Peregrin, T. 2001. The new frontier of nutrition science: nutrigenomics. *Journal of the American Dietetic Association*. 101: 1306.

- Pierson, T.M.; Torres, P.A.; Zeng, B.J.; Glanzman, A.M.; Adams, D.; Finkel, R.S.; Mahuran, D.J.; Pastores, G.M.; Tennekoon, G.I. & Kolodny, E.H. 2013. Juvenile-onset motor neuron disease caused by novel mutations in β -hexosaminidase. *Molecular Genetics and Metabolism*. 108: 65-69.
- Piper, M.D.; Selman, C.; McElwee, J.J. & Partridge, L. 2008. Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *Journal of Internal Medicine*. 263: 179–191.
- Postlethwait, J. H. & Giorgi, F. 1985. Vitellogenesis in insects. In *Developmental Biology – A Comprehensive Synthesis* (ed. E. Browder). 85-126. New York, NY: Plenum Press.
- Pruitt, K.D.; Tatusova, T.; Brown, G.R. & Maglott, D.R. 2012. NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Research*. 40(Database issue): 130-135.
- Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 41(Database issue): 590-596.
- Rinderer, T.E. & Elliott, K.D. 1977. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*. *Journal of Economic Entomology*. 70: 431-433.
- Roberts, A.; Trapnell, C.; Donaghey, J.; Rinn J.L.; Pachter L. 2011. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biology*. 12:22.
- Roberts, M.A.; Mutch, D.M. & German, J. B. 2001. Genomics: food and nutrition. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 516-522.
- Robinson, G. E. 2002. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *The American Naturalist*. 160: 160-172.
- Robinson, G.E.; Fahrbach, S.E. & Winston, M.L. 1997. Insect societies and the molecular biology of social behavior. *Bioessays*. 19, 1099–1108.
- Roeder, T. 1999. Octopamine in invertebrates. *Progress in Neurobiology*. 59: 533-561.
- Rosenbaum, E.E.; Vasiljevic, E.; Brehm, K.S. & Colley, N.J. 2014. Mutations in Four Glycosyl Hydrolases Reveal a Highly Coordinated Pathway for Rhodopsin Biosynthesis and N-Glycan Trimming in *Drosophila melanogaster*. *Plos Genetics*. 1;10(5).
- Rottiers, V. & Näär, A.M. 2013. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13: 239-250.
- Roulston, T.H. & Cane, J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*. 222: 187-209.
- Roux, O.; Gers, C. & Legal, L. 2008. Ontogenetic study of three Calliphoridae of forensic importance through cuticular hydrocarbon analysis. *Medical and Veterinary Entomology*. 22: 309–317.
- Russell, S.J. & Kahn, C.R. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 681–691.
- Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream, M.A. & Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 16(10): 944-945.
- Sappington, T.W. & Raikhel, A.S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 277–300.

- Schmidt, J.O.; Thoenes, S.C. & Levin, M.D. 1987. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. Annual Entomology Society of America. 80: 176–183.
- Schmieder, R. & Edwards, R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics. 27: 863–864.
- Schmittgen, T.D.; Jiang, J.; Liu, Q. & Yang, L. 2004. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. Nucleic Acids Research. 32(4): 43.
- Schulz, R. & Heckhausen, J. 1996. A life span model of successful aging. American Psychologist. 51(7): 702-714.
- Seehuus, S.C.; Norberg, K.; Gimsa, U.; Krekling, T. & Amdam, G.V. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103, 962–967.
- Seeley, T.D. 1994. Honey bee foragers as sensory units of their colonies. Behavioral Ecology and Sociobiology. 34 (1): 51-62.
- Seifried, H.E.; Anderson, D.E.; Fisher, E.I. & Milner, J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. Journal of Nutritional Biochemistry 18: 567-579.
- Sempere, L.F.; Sokol, N.S.; Dubrovsky, E.B.; Berger, E.M. & Ambros V. 2003. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. Developmental Biology. 259(1):9–18.
- Singer, T.L. & Espelie, K. E. 1992. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. Animal Behavior. 44, 63-68.
- Singer, T.L. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. American Zoologist. 38: 394-405.
- Sohal, R.S. & Orr, W.C. 2012. The redox stress hypothesis of aging. Free Radical Biology and Medicine. 52: 539-555.
- Sorg, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? Comptes Rendus Biologies. 327: 649 – 662.
- St. Pierre, S.E.; Ponting, L.; Stefancsik, R.; McQuilton, P. and the FlyBase Consortium 2014. FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. Nucleic Acids Research. 42(D1):D780-D788.
- Stanley, R.G. & Linskens, H.F. 1974. Pollen: Biology, biochemistry, management. Heidelberg, Germany: Springer.
- Stark, A.J.; Brennecke, R.B.; Russell and S. M. Cohen. 2003. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. PLoS Biol 1(3): E60.
- Stark, R. & Kibbey, R.G. 2014. The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: Has it been overlooked? Biochimica et Biophysica Acta. 1840: 1313-1330.
- Stockstad, E. 2007. The case of the empty hives. Science. 316 (5827): 970-972.
- Svilar, D.; Goellner, E.M.; Almeida, K.H. & Sobol, R.W. 2010. Base Excision Repair and lesion-dependent sub-pathways for repair of oxidative DNA damage. Antioxidants and Redox Signaling. 1- 47.
- Tachibana, K.; Sakurai, K.; Yokoh, H.; Ishibashi, T.; Ishikawa, K.; Shirasawa T & Yokote, K. 2014. Mutation in Insulin Receptor Attenuates Oxidative Stress and Apoptosis in Pancreatic Beta-Cells Induced by Nutrition Excess: Reduced Insulin Signaling and ROS. Hormone and Metabolic Research. [Epub ahead of print].

- Teleman, A.A.; Maitra, S. & Cohen, S.M. 2006. *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes and Development*. 20(4): 417-422.
- Toth, A.L. & Robinson, G.E. 2005. Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*. 69:427– 435.
- Toth, A.L.; Kantarovich, S.; Meisel, A.F. & Robinson, G.E. 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *The Journal Experimental Biology*. 208:4641–4649.
- Trapnell, C.; Hendrickson, D.G.; Sauvageau, M.; Goff, L.; Rinn, J.L. & Pachter, L. 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*. 31: 46-53.
- Trapnell, C.; Williams B.A.; Pertea G.; Mortazavi A.; Kwan G.; van Baren, M.J.; Salzberg S.L.; Wold, B.J. & Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*. 28(5): 511-515.
- Ugochukwu, N.K.; Mukes, J.D. & Figgers, C.L. 2006. Ameliorative effects of dietary caloric restriction on oxidative stress and inflammation in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta*. 370: 165–173.
- Varghese, J.; Lim, S.F. & Cohen, S.M. 2010. *Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, sugarbabe. *Genes and Development*. 24(24):2748-2753.
- Wang, H.; Zhang, S.W.; Zheng, G.J. & Yan, W.Y. 2014. Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*. 45(5): 618-625.
- Wang, Y.; Amdam, G.V.; Rueppell, O.; Wallrichs, M.; Fondrk, M.K.; Kaftanoglu, O.; Page, R.E.J. 2009. PDK1 and HR46 gene homologs tie social behavior to ovary signals. *PLoS ONE*. 4:e4899.
- Wang, Y.; Brent, C.S.; Fennern, E. & Amdam, G.V. 2012. Gustatory perception and fat body energy metabolism are jointly affected by vitellogenin and juvenile hormone in honey bees. *PLoS Genetics*. 8(6): e1002779.
- Wang, Y.; Mutti, N. S.; Ihle, K. E.; Siegel, A.; Dolezal, A. G.; Kaftanoglu, O. & Amdam, G. V. 2010. Down-regulation of honey bee IRS gene biases behavior toward food rich in protein. *PLoS Genetics*. 6(4): e1000896.
- Watkins, D.W.; Armstrong, C.T. & Ross Anderson, J.L. 2014. De novo protein components for oxidoreductase assembly and biological integration. *Current Opinion in Chemical Biology*. 19: 90-98.
- Wei, H.; Zhikuan, J. & Qingfang, H. 2007. Effects of herbivore stress by *Aphis medicaginis* Koch on the Malondialdehyde contents and the activities of protective enzymes in different alfalfa varieties. *Acta Ecologica Sinica*. 27(6): 2177–2183.
- Whitfield, C.W.; Bem-Shahar, Y.; Brillet, C.; Leoncini, I.; Crauser, D.; LeConte, Y.; Rodriguez-Zas, S. & Robinson, G.E. 2006. Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(44): 16068-16075.
- Whitfield, C.W.; Cziko, A.M. & Robinson, G.E. 2003. Gene Expression Profiles in the Brain Predict Behavior in Individual Honey Bees. *Science*. 302 (5643): 296-299.
- Willians, J.B.; Roberts, S.P. & Elekonich, M.M. 2008. Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. *Experimental Gerontology*. 43: 538-549.
- Winston, M.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge: Harvard Univ Press.

- Withers, G.S.; Fahrbach, S.E. & Robinson, G.E. 1993. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature*. 364(6434):238–240.
- Wolschin, F. & Amdam, G. V. 2007. Plasticity and robustness of protein patterns during reversible development in the honey bee (*Apis mellifera*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 1095-1100.
- Xu, H.; Ye, G.Y.; Xu, Y.; Hu, C. & Zhu, G.H. 2014. Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*. 242: 236–241.
- Young, H.P. & Schal, C. 1997. Cuticular hydrocarbon synthesis in relation to feeding and developmental stage in nymphs of *Blattella germanica* (Dictioptera: Blattellidae). *Annals of Entomological Society of America*. 90 (5): 655-663.
- Zayed, A. & Robinson, G.E. 2012. Understanding the Relationship Between Brain Gene Expression and Social Behavior: Lessons from the Honey Bee. *Annual Review of Genetics*. 46: 589-613.
- Zayed, A.; Neager, N.L.; Rodriguezas, S.L. & Robinson, G.E. 2011. Common and novel transcriptional routes to behavioral maturation in worker and male honey bees. *Genes, Brain and Behavior*. 11:253–261.
- Zhang, Y.; Sun, G.; Yang, M.; Wu, H.; Zhang, J.; Song, S.; Ma, E. & Guo, Y. 2011. Chronic accumulation of cadmium and its effects on antioxidant enzymes and malondialdehyde in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(5):1355-1362.