**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos**

**O metabolismo oxidativo na diferenciação de castas em abelhas melíferas:
número e estrutura mitocondrial e expressão de genes indicadores de
funcionalidade**

Douglas Elias Santos

**Ribeirão Preto – SP
2017**

DOUGLAS ELIAS SANTOS

O metabolismo oxidativo na diferenciação de castas em abelhas melíferas: número e estrutura mitocondrial e expressão de genes indicadores de funcionalidade

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para a obtenção do título Doutor em
Ciências, área de concentração: Biologia Celular e
Molecular

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Santos, Douglas Elias

O metabolismo oxidativo na diferenciação de castas em abelhas melíferas: número e estrutura mitocondrial e expressão de genes indicadores de funcionalidade. Ribeirão Preto, 2017.

113 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Hartfelder, Klaus Hartmann

1. *Apis mellifera*. 2. Diferenciação de castas. 3. Mitocôndria. 4. Metabolismo oxidativo. 5. Corpo gorduroso.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Douglas Elias.

Título: O metabolismo oxidativo na diferenciação de castas em abelhas melíferas: número e estrutura mitocondrial e expressão de genes indicadores de funcionalidade.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
para a obtenção do título Doutor em Ciências, área de
concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Sonho... à minha família...

AGRADECIMENTOS

Ao professor Klaus Hartfelder pelo profissionalismo e pela oportunidade de realizar este trabalho.

A professora Luciane Alberici pelas orientações sem a qual grande parte desse trabalho não teria sido realizada.

Aos companheiros de laboratório: Gustavo, Mário, Carlos, Denyse, Giovanna, Roseli, Josephine e Dr. Karina Guidugli-Lazzarini pela amizade e inúmeros momentos de troca de saberes.

À técnica Elizabeth Milani pelo auxílio na microscopia confocal.

Aos técnicos Maria Dolors Seabra Ferreira, Maria Teresa Picinoto Maglia e José A. Maulin pelo auxílio no processamento das amostras e fotografia no microscópio eletrônico.

Ao técnico Luiz Aguiar pela coleta das abelhas e treinamento no apiário.

À técnica Izilda e Vani Alves pelo auxílio aos cortes histológicos e pelos inúmeros conselhos.

Aos estudantes Carlos Dechandt e Anderson Souza pela ajuda com os procedimentos de análise mitocondrial.

Aos amigos e professores do programa de Biologia Celular e Molecular.

A minha mãe Wilma e meu pai João que sempre me apoiaram, bem como ao meu braço direito Denis, meu irmão.

À Aline que durante parte desse trabalho foi suporte para continuar e não abandoná-lo.

Aos amigos do Ministério Universidades Renovadas pela sincera amizade.

Agradeço a causa final de Sócrates, ao ser em ato puro de Aristóteles, ao princípio norteador da cosmologia antrópica imaterial, atemporal, oniciente e unipresente que se revela pelo seu mistério junto à humanidade. Traduzido em verdade, porém esquecido pelo pecado original, a qual o homem padece sem perceber. Agradeço a Este que vulgam ser Deus.

À FAPESP (processo nº2013/24733-7) pelo suporte financeiro.

"Verbum Caro Factum Est"

RESUMO

SANTOS, Douglas Elias. O metabolismo oxidativo na diferenciação de castas em abelhas melíferas: número e estrutura mitocondrial e expressão de genes indicadores de funcionalidade. [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

A relação entre nutrição e fenótipo é uma questão especialmente desafiadora em casos de polifenismo facultativo, como no caso das castas de insetos sociais, por exemplo, a abelha melífera *Apis mellifera*. Após estudos de vias de sensoriamento de nutrientes, modificações inesperadas nestas vias de sinalização revelaram a resposta à hipóxia como um possível mecanismo subjacente à regulação do tamanho corporal e crescimento de órgãos. Uma vez que essa resposta está intimamente ligada a condições metabólicas das células, o presente estudo foi concebido para investigar possíveis alterações no metabolismo mitocondrial e oxidativo no processo de diferenciação de castas em *A. mellifera* na fase larval, com foco no corpo gorduroso, que é o centro metabólico dos insetos. Partindo da hipótese de que rainhas e operárias são criadas em células de cria abertas sob condições iguais de disponibilidade de oxigênio, nós investigamos o número e a distribuição mitocondrial, bem como as taxas de consumo de oxigênio em mitocôndrias de células de corpo gorduroso durante estágios larvais críticos. Por meio de análises de imunofluorescência e microscopia eletrônica encontramos maior densidade de mitocôndrias no corpo gorduroso larval da rainha, dado corroborado pela quantificação de unidades funcionais mitocondriais por ensaio de citrato sintase. Medições de consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução revelaram que as larvas de rainha têm capacidades máximas mais altas de produção de ATP, com menor demanda fisiológica, mas com mesma eficiência mitocondrial que operárias. A análise da expressão de fatores relacionados à mitogênese mostrou que os homólogos dos genes codificadores dos fatores de transcrição TFB1 e TFB2 e de um regulador nutricional, ERR, estão mais expressos em larvas de rainha. Apesar das diferenças encontradas na respiração mitocondrial entre as duas castas, as mesmas apresentaram níveis similares de produção de lactato e peróxido de hidrogênio, sem grandes alterações referentes à condições de estresse oxidativo e ao estado redox das células. Encontramos altos níveis de expressão de genes codificadores das enzimas do sistema antioxidante MnSOD e catalase em células do corpo gorduroso larval de rainha, que garantem

a redução de eventuais danos oxidativos. Estes resultados são fortes evidências de que a nutrição diferencial das larvas pelas operárias adultas, como estímulo externo da indução do desenvolvimento das castas, diferencialmente afeta a dinâmica e funcionalidade mitocondrial como elemento intrínseca da plasticidade fenotípica neste inseto social.

Palavras-chave: *Apis mellifera*. Diferenciação de castas. Mitocôndria. Metabolismo oxidativo. Corpo gorduroso.

ABSTRACT

SANTOS, Douglas Elias. Oxidative metabolism in caste differentiation in honeybees: number and structure of gene expression and mitochondrial functional indicators. [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2017.

The connection between nutrition and phenotype is a particularly challenging issue in cases of facultative polyphenism, as for instance in the honeybee *Apis mellifera*. After studies on nutrient sensing pathways found unexpected modifications in these signaling pathways, a response to hypoxia was revealed as a possible mechanism underlying regulation of body size and organ growth. Since this response is closely linked to the metabolic conditions of the cells, the present study was designed to investigate the role of the mitochondrial and oxidative metabolism in the fat body of honeybee larvae, which is the metabolic center in insects, in the context of the caste differentiation process in *A. mellifera*. Based on the fact that honey bee larvae are reared in open brood cells, the queen and worker larvae should be exposed to equal oxygen diffusion conditions, and hence we investigated mitochondrial number and intracellular distribution, as well as rates of mitochondrial oxygen consumption in fat body cells during the larval stages critical for caste differentiation. By means of immunofluorescence and electron microscopy we found a higher density of mitochondria in the fat body of queen larvae. This result was corroborated by the quantification of mitochondrial functional units using a citrate synthase assay. Measurements of oxygen consumption obtained by high resolution respirometry revealed that queen larvae have higher maximum capacities of ATP production, with less physiological demand and higher mitochondrial efficiency than workers. Analysis of the expression of genes related to mitogenesis showed that *Apis* homologs of the transcription factors TFB1 and TFB2 and of the nutritional regulator, ERR are higher expressed in queen larvae. Despite differences in mitochondrial respiration, the two castes presented similar levels of lactate and hydrogen peroxide production, and without major change in oxidative stress and cellular redox status. The high transcriptional levels of genes encoding enzymes of the antioxidant system, MnSOD and catalase observed in fat body cells of queen larvae guarantee that oxidative damage is reduced during larval development. These results are strong evidence that the differential nutrition of honey bee larvae by the adult worker, as the external stimulus for caste induction,

differentially affects mitochondrial dynamics and functionality as an intrinsic element of phenotypic plasticity in this social insect.

Keywords: *Apis mellifera*. Caste differentiation. Mitochondria. Oxidative metabolism. Fat body.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.2	A abelha <i>Apis mellifera</i> e o desenvolvimento de suas castas	13
1.2	Fatores endógenos identificados como determinantes de castas em <i>A. mellifera</i> .	15
1.2.1	Hormônio juvenil e rota insulina-TOR	15
1.2.2	Hipóxia endógena	18
1.2.3	Efeito Warburg e espécies reativas de oxigênio	20
1.2.4	Dinâmica mitocondrial e metabolismo oxidativo	21
1.3	Corpo gorduroso como sede do metabolismo intermediário larval.....	22
2	OBJETIVOS	23
2.2	Objetivos gerais	23
2.3	Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.2	Coleta das larvas de <i>A. mellifera</i>	24
3.3	Análise da distribuição mitocondrial por imunofluorescência	25
3.4	Microscopia eletrônica de transmissão.....	25
3.5	Ensaio de atividade da citrato sintase.....	26
3.6	Medições de consumo de oxigênio	26
3.7	Análise de expressão gênica de genes de biogênese mitocondrial e enzimas antioxidantes	29
3.7.1	Extração de RNA e síntese de cDNA	29
3.7.2	Primers	30
3.7.3	Ensaio de reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR)	32
3.7.4	Cálculo de expressão relativa	32
3.8	Medição dos níveis de lactato	33
3.9	Medição dos níveis de peróxido de hidrogênio	33
3.10	Medida dos níveis de proteína carbonilada e níveis de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG)	34
3.10.1	Proteína Carbonilada.....	34
3.10.2	Relação GSH/GSSG	35
4	RESULTADOS	36

4.1	Densidade mitocondrial, distribuição e morfologia das mitocôndrias do corpo gorduroso larval.....	36
4.2	Consumo mitocondrial de oxigênio e controle do fluxo mitocondrial	45
4.3	Expressão de genes candidatos relacionados à biogênese mitocondrial	52
4.4	Medida nos níveis de lactato	53
4.5	Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e expressão de genes antioxidantes	54
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	ANEXO A.....	80
	ANEXO B- Publicações em periódicos internacionais durante o doutorado.	81
	ANEXO C- Manuscrito em preparação	97

1 INTRODUÇÃO

1.2 A abelha *Apis mellifera* e o desenvolvimento de suas castas

Apis mellifera é uma espécie de abelha que apresenta importante papel econômico e ecológico como polinizador de culturas agrícolas e matas nativas (1). São insetos sociais da ordem Hymenoptera, e sendo insetos holometábolos, apresentam metamorfose completa, passando pelos estágios de embrião, larva, pupa até se tornarem adultos. As abelhas melíferas vivem em colônias organizadas cujos indivíduos se dividem em castas com diferentes funções cooperativas. Os indivíduos machos são haplóides e basicamente possuem como única função o acasalamento com as rainhas virgens, e morrem após a cópula. Já as fêmeas possuem funções mais variadas e são divididas em dois tipos de castas morfológica e funcionalmente distintas denominadas de rainhas e operárias. As diferenças entre as castas são nitidamente observadas na fase adulta, quanto a sua morfologia, fisiologia, longevidade e comportamento (2). As rainhas são responsáveis pela reprodução da colônia, uma vez que botam ovos fecundados pelos espermatozoides armazenados na espermateca, uma estrutura associada ao seu trato reprodutor. Já as operárias são responsáveis pelo trabalho de manutenção da colônia, exercendo diversas atividades acompanhadas de mudanças morfo-fisiológicas e comportamentais. A princípio, estas atividades incluem limpeza da colônia, alimentação das larvas, alimentação da rainha, produção de cera, construção de favos, manutenção da temperatura da colônia, defesa da colônia e atividades de coleta e processamento de pólen, néctar, própolis e água (3).

Essas diferenças marcantes entre rainhas e operárias adultas de *A. mellifera* começam surgir durante o desenvolvimento larval. A princípio, o desenvolvimento larval consiste de cinco instares (fases L1, L2, L3, L4 e L5), passando por mudas larvais de primeiro até o quinto instar, sendo que no final deste a larva sofre metamorfose e adquire as características de pupa. O interessante é que até o quarto estágio (fase L4) o tempo de desenvolvimento das larvas de rainhas e operárias é o mesmo. Sendo assim as diferenças na dinâmica do desenvolvimento surgem apenas a partir do quinto estágio larval (fase L5) e, especialmente, na fase pupal. Ao final, rainhas adultas emergem em aproximadamente 16 dias após a oviposição, enquanto operárias possuem um tempo mais prolongado de desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, totalizando aproximadamente 22 dias (4, 5).

A diferenciação de castas em *A. mellifera* ocorre a partir de um mesmo genótipo, que responde a estímulos externos durante o processo de desenvolvimento larval, o que acarreta em respostas específicas do sistema endócrino (6). Essas respostas são induzidas pela alimentação diferencial que rainhas e operárias recebem durante os primeiros estágios larvais e que promovem níveis diferentes do hormônio juvenil na hemolinfa (7). Sendo assim, larvas que receberam grandes quantidades de geleia real, uma secreção das glândulas hipofaríngeas e mandibulares das nutridoras, durante todo o seu período de crescimento irão desenvolver-se em rainhas. Por outro lado, larvas que receberam geleia de operária, menos rica em carboidratos, durante os três primeiros dias e, em seguida, uma dieta mista de secreção glandular, pólen e mel durante os próximos dois dias de seu período de crescimento, irão se tornar operárias (8). O resultado deste programa de alimentação diferencial é que operárias adultas são facultativamente estéreis, possuindo apenas pequenos ovários, menor tamanho corporal, vida adulta de curta duração dentro da qual exercem várias funções de manutenção da colônia (**Figura 1**). Em contraste, as rainhas são altamente reprodutivas, devido a seus grandes ovários, possuem tamanho do corpo maior, e durante sua longa vida adulta sua única função dentro da colônia é reproduzir (3, 7).

Figura 1: *Apis mellifera* como modelo de estudo de plasticidade fenotípica.

A partir de uma larva indiferenciada e bipotente, rainhas e operárias se desenvolvem em decorrência a um programa de alimentação diferencial. Este programa induz tempos de desenvolvimento distintos (22 dias para operárias e 16 dias para rainhas) e grandes diferenças fisio-morfológicas e de funcionalidade na colônia durante a vida adulta das castas. Fonte: Baseado em Michener (1974) e Hartfelder K, Engels W (1998). Imagens Alex Wild© e Adam Tofilski©.

1.2 Fatores endógenos identificados como determinantes de castas em *A. mellifera*

1.2.1 Hormônio juvenil e a via insulina-TOR

Dada as grandes diferenças entre rainhas e operárias surge uma questão intrigante: como as diferenças aparentemente simples na alimentação podem causar diferenças morfológicas e de história de vida tão drásticas? Em essência, colocando em termos de

conceitos atuais em biologia de desenvolvimento, a questão é como variantes nutricionais são traduzidos em padrões de expressão gênica diferencial que podem moldar os fenótipos adulto das castas (9, 10). Essa questão moveu vários trabalhos científicos por pesquisadores no mundo todo em busca de respostas.

Uma dessas primeiras respostas veio através do estudo dos títulos de hormônio juvenil durante o desenvolvimento das larvas de *A. mellifera*. Deste modo o primeiro fator endógeno identificado como um sinal da determinação de castas foi um elevado título de hormônio juvenil em larvas de rainha (4, 6, 7). A princípio, os níveis de hormônio juvenil atingem um elevadíssimo pico durante a fase L3 de larvas de rainhas, decaindo em nível até as fases de alimentação do quinto instar larval e subindo novamente nas fases da metamorfose (tecelagem de casulo e pré-pupa) (**Figura 2**). Nas operárias os títulos hormonais também acompanham esse padrão de modulação, mas em níveis muito menores. Um dos principais efeitos deste sinal hormonal é prevenir a morte celular programada no ovário larval da rainha (11), representando, portanto a base para o potencial desenvolvimento de fêmeas altamente reprodutivas.

Figura 2. Títulos de hormônio juvenil ao longo do desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de rainhas e operárias de *A. mellifera*.

Nesta representação gráfica é possível acompanhar todos os estágios de desenvolvimento em relação aos níveis de hormônio juvenil para rainhas (barra azul) e operárias (barra vermelha): ovo, larvas de primeiro, segundo, terceiro e quarto instar (L1, L2, L3 e L4), larvas de quinto instar (L5) durante a fase de alimentação (*feeding phase*, F1, F2 e F3), seguida pela fase de tecelagem de casulo (*spinning phase*, S1, S2 e S3) e pela fase pré-pupal (PP1, PP2 e PP3), pupa e adulto, quando o indivíduo já emergiu da célula de cria. Fonte: Adaptado de Hartfelder e Engels (1998).

Outras vias de sinalização conhecidas por afetar o crescimento e diferenciação nos metazoários começaram a ser investigados a partir do sequenciamento do genoma da abelha, que foi publicado em 2006 por um grande consórcio internacional (12). Estes dados facilitaram enormemente a identificação e expressão de genes, tornando possível investigações em grande escala sobre fatores e mecanismos moleculares responsáveis por esta diferença entre as castas (13). Deste modo, experimentos têm revelado algumas vias de sinalização que são essenciais para o processo de diferenciação das castas em *A. mellifera*.

As primeiras vias candidatas que vieram a serem estudadas foram a via de sinalização insulínica (IIS) e a via TOR (14). Estas vias são altamente conservadas e atuam no controle do crescimento em eucariotos e metazoários Bilateria (15). Os primeiros estudos voltados para a rota insulínica tiveram como alvo os peptídeos semelhantes à insulina (*insulin-like*), AmILP1 e AmILP2, e os respectivos receptores insulínicos, AmInR1 e AmInR2. A princípio, os genes que codificam o peptídeo semelhante à insulina *amILP-1* mostraram-se consistentemente mais expressos em larvas de rainhas, ao passo que *amILP-2* é mais expresso em larvas de operárias, assim indicando possíveis funções diferentes para os dois tipos de peptídeos na regulação do crescimento e sensorimento nutricional (8). Estes dados foram reforçados quando se observou que *Amilp2* era mais expresso quando larvas de rainha experimentalmente receberam alimentação de operárias, e que o mesmo ocorria com *Amilp1* em larvas de operárias transferidas para receber o regime de alimentação das rainhas (14). Contraditoriamente, a expressão dos dois genes codificadores dos dois receptores de insulina, AmInR1 e AmInR2, apresenta queda acentuada principalmente em larvas de rainha, justamente no período em que estas excedem as larvas de operárias nas suas taxas de crescimento (16).

A rota insulínica se comunica com a via TOR através da regulação das proteínas AKT e TSC (**Figura 3**), e sua atividade tem sido descrita por afetar fortemente o processo de diferenciação de castas. Esta afirmação se deve ao fato de que o *knockdown* por RNA interferência (RNAi) do gene *amtora* de larvas criadas com geleia real resultou no fenótipo de operárias (17). Contraditoriamente, a análise de expressão *amtora* no desenvolvimento de larvas revelou posteriormente que este gene chave é mais expresso em larvas de operárias e não em larvas de rainha culminando em outro paradoxo. Não obstante, os níveis de expressão gênica de outras rotas de controle de crescimento influenciadas diretamente pela rota

insulínica-TOR, como amFOXO e amEGFR, também se mostraram mais elevadas em larvas de operárias (8).

1.2.2 Hipóxia endógena

Uma possível explicação para os resultados contraditórios às expectativas sobre o papel da via IIS/TOR no desenvolvimento das castas em abelhas melíferas surgiu a partir da investigação da via de sinalização de hipóxia, que é conhecida por ser funcionalmente integrada com IIS/TOR em *Drosophila* (18) (**Figura 3**). O fenômeno de hipóxia pode ser definido como um limite no qual a concentração de oxigênio é o fator limitante para processos celulares normais (19), devido ao fato do oxigênio ser um fator essencial para o metabolismo, incluindo a produção de ATP. Este fenômeno ativa sistemas moleculares sensoriais ajustando a fisiologia da célula aos níveis de oxigênio do meio ambiente, convergindo em rotas sinalizadoras capazes de modular a expressão gênica, como por exemplo, através da modulação das duas subunidades de fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIF α e HIF β) bem como a prolina-hidroxilase, PHD. HIF α e HIF β , cujos ortólogos nos insetos respectivamente Sima e Tango, são membros de uma família de fatores de transcrição bHLH-PAS (do inglês, *Helix-Loop-Helix-Period-Arnt-Single-minded*). Quando em condições de normóxia, a enzima PHD (Fatiga nos insetos) hidroxila resíduos de prolina da molécula de HIF α e estes resíduos são reconhecidos pela E3 ubiquitina ligase, von Hippel-Landau (pVHL), e tal induz a degradação de HIF α via proteassoma (20, 21). Por outro lado, quando os níveis de oxigênio se encontram baixos, a atividade da enzima PHD é reduzida, assim tornando HIF α mais estável e permitindo a translocação deste fator para o núcleo, onde forma um dímero funcional com HIF β , podendo assim se ligar elementos responsivos a HIF e controlar regiões genicas hipóxica-reguladas.

Em abelhas melíferas a análise da expressão dos três genes essenciais da via de hipóxia, *amsima*, *amtango* e *amfatiga*, mostrou que estes são mais expressos em larvas de operária ao longo das fases críticas do desenvolvimento da casta. Isto sugere uma resposta hipóxica como um processo importante de regulação da diferenciação de castas em *A. mellifera* (22). O interessante é que larvas de rainhas e operárias não são criadas em diferentes condições de disponibilidade de oxigênio, já que ambas recebem alimentação diferencial em células de cria abertas. Deste modo a explicação para tal resultado aponta para um possível estado de hipóxia endógeno e que supostamente haveria alguma ligação com o metabolismo oxidativo larval (**Figura 4**).

Figura 3. A resposta hipóxica e sua conexão com a rota sensorial de nutrientes insulina-TOR.

Este gráfico foi baseado no modelo proposto para *Drosophilla melanogaster* (18) e publicado em uma das revisões recentes de nosso grupo (Hartfelder et al., 2015). O baixo nível de oxigênio inibiria a atividade de PHD (fátiga nos insetos), permitindo a entrada de HIFα (sima) e permitindo a translocação deste fator para o núcleo onde este forma um dímero funcional com HIFβ (tango) podendo assim se ligar elementos responsivos a HIF e controlar regiões genicas hipóxica-reguladas. O estudo de Azevedo e colaboradores (22) colocou em evidência a super-expressão dos três genes principais na modulação da resposta a hipóxia durante o desenvolvimento de *A. mellifera*, Amfátiga, Amsima e Amtango. Fonte: Retirado diretamente de Hartfelder et al. (2015).

Figura 4. Rainhas e operárias são criadas em células de cria abertas e, assim, sob as mesmas condições atmosféricas.

Fonte: Adaptado de <https://www.flickr.com/photos/bienenwabe/2789384392>.

1.2.3 O efeito Warburg e espécies reativas de oxigênio

A regulação hipóxica tem sido diretamente associada com mudanças metabólicas observadas em tumores cancerígenos em mamíferos. Foi observado que células do interior destes tumores produzem grande quantidade de lactato devido ao uso de glicólise aeróbica e redução da fosforilação oxidativa mitocondrial, mesmo quando estas células adquirem posteriormente disponibilidade adequada de oxigênio. Esse fenômeno metabólico foi descrito por Otto Warburg (23) e é conhecido na literatura como efeito Warburg. Estas células utilizam a glicólise aeróbia com fosforilação oxidativa mitocondrial reduzida, mesmo com disponibilidade adequada de oxigênio (24), e a superexpressão de HIF α é considerada crítica para a sua adaptação metabólica à hipóxia (25). O HIF-1 em mamíferos não apenas induz a expressão de genes que codificam enzimas glicolíticas, como também aumenta a sua atividade e regula a indução hipóxica da lactato desidrogenase A (26). A consequência metabólica é uma maior conversão da glicose em piruvato e, subsequentemente, aumento da produção de lactato (25). Para isso, é necessário ocorrer não só o aumento dos níveis de mRNA de HIF α mas também a estabilização da proteína sensível ao oxigênio. Este processo de estabilização tem sido associado a espécies reativas de oxigênio (ROS) que impedem a degradação proteossomal de HIF α através da inibição da PDH (27-30).

ROS incluem ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$). O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido principalmente como produto da respiração aeróbica durante a reação da transferência de elétrons na cadeia respiratória ou pela ação de NADPH oxidases, e por algum tempo tem sido descrito como protagonista do estresse oxidativo, danificando lipídios, proteínas e material genético (31-33). Sendo assim, de modo a neutralizar os efeitos danosos de ROS, as células desenvolveram evolutivamente mecanismos de defesa antioxidantes. A primeira linha de defesa inclui enzimas como superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial, CuZnSOD e MnSOD, respectivamente, que desintoxicam $O_2^{\bullet-}$ em espécies menos reativas, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A segunda linha de defesa inclui enzimas como a catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, glutathione peroxidase e a proteína glutathione reduzida (GSH) (34). Além disso, outras classes de enzimas, como as glutathione transferases, previnem a formação de eletrófilos provenientes da peroxidação excessiva de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares (35). Apesar de induzir estresse oxidativo, tornou-se evidente que as ROS também têm funções de sinalização que permitem adaptações

às mudanças na disponibilidade de nutrientes e no ambiente oxidativo, bem como a modulação da respiração mitocondrial. Essa função requer a oxidação de resíduos de cisteína por meio de peróxido de hidrogênio que causa mudanças alostéricas dentro da proteína que alteram a sua função (36). Estes dados abrem margem para um possível papel de ROS na regulação do metabolismo larval durante o desenvolvimento das larvas de rainha e operária em *A. mellifera*. Assim, para a correta compreensão desse papel deve-se entender a fonte de produção principal, que é a fosforilação oxidativa mitocondrial.

1.2.4 Dinâmica e metabolismo mitocondrial

Estudos anteriores realizados nos anos trinta já mostraram que as larvas de rainha têm maiores taxas de consumo de O₂ do que larvas de operárias, indicando diferenças na utilização metabólica de nutrientes em larvas diferencialmente alimentadas (37). Além disso, através da quantificação de proteínas mitocondriais, Osanai e Rembold (38) demonstraram que rainhas têm maior quantidade de mitocôndria, usando o citocromo c como um indicador da capacidade respiratória, e Eder e colaboradores (39) calcularam que as larvas de rainha possuem taxas respiratórias seis vezes maior do que larvas de operárias. Subsequentemente, um estudo para investigar a expressão de genes mitocondriais (40) confirmou estas descobertas fisiológicas e bioquímicas anteriores, que agora são consistentes com a hipótese de hipóxia endógena em larvas operárias (8, 22). Em conjunto, estes dados indicam que o metabolismo mitocondrial deve desempenhar um papel crucial no processo de diferenciação de castas em abelhas *A. mellifera* no qual há diferenças significativas na expressão de genes relacionados com o metabolismo oxidativo.

É estabelecido que o controle do metabolismo celular através de vias de sensoriamento de nutrientes é diretamente impactado e relacionado à fisiologia mitocondrial, incluindo a biogênese mitocondrial e mudanças na forma e função das mitocôndrias (41, 42). Um dos reguladores mestre de alterações mitocondriais em insetos é Spargel, o ortólogo de PCG-1 α em mamíferos. Spargel é envolvido na homeostase energética, controle da proliferação mitocondrial e é capaz de responder a nutrientes através da sinalização via TOR e de uma proteína quinase sensorial da relação AMP/ATP denominada AMPK (41, 43). Spargel controlaria fatores de transcrição mitocondriais A, B1 e B2, relacionado com a transcrição e replicação do DNA mitocondrial, e um receptor relacionado ao estrógeno (ERR) que regula a transcrição de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais (44-46). Sendo assim, a partir da hipótese de que o metabolismo mitocondrial deve desempenhar um papel crucial no

processo de diferenciação de castas em abelhas *A. mellifera*, o estudo de possíveis candidatos gênicos a controlar os processos de biogênese mitocondrial ganha notória importância.

1.3 Corpo gorduroso como sede do metabolismo intermediário larval

O corpo gorduroso das larvas de abelhas melíferas é um órgão de origem mesodérmica que preenche a cavidade abdominal. Ele é constituído em grande parte por células denominadas trofócitos, mas contendo também uma pequena quantidade de enócitos e urócitos (47).

Durante a fase larval das abelhas, bem como em outros insetos, o corpo gorduroso tem como função primordial acumular reservas de lipídios, carboidratos e aminoácidos, os quais serão mobilizados para obter energia e demais nutrientes para o processo de metamorfose. Os lipídeos provenientes da dieta larval são digeridos, convertidos em diacilglicerol e exportados para a hemolinfa, ligados a apolipoproteínas e são entregues aos trofócitos na forma de triacilglicerol (48). Os carboidratos, por sua vez, são convertidos para trealose durante a digestão, que por sua vez é convertido em glicose na hemolinfa (48). A glicose é subsequentemente entregue ao corpo gorduroso através de transportadores específicos de membrana (48, 49). No corpo gorduroso, a glicose é armazenada sob a forma de glicogênio, que pode ser mobilizado e liberado na hemolinfa na forma de trealose para utilização (50). Os aminoácidos provenientes da digestão são também liberados na hemolinfa e capturados via diversos transportadores de membrana nos trofócitos (48). Devido a todas estas evidências obtidas nos mais diversos modelos de insetos holometábolos, o órgão do corpo gorduroso é um forte candidato a exercer o controle do metabolismo celular através de vias de sensoramento de nutrientes, podendo influenciar diretamente no controle do processo de diferenciação de castas em *A. mellifera*.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel da estrutura mitocondrial, dinâmica e metabolismo oxidativo no processo de diferenciação de castas em *Apis mellífera* através do estudo do corpo gorduroso de larvas de abelhas melíferas.

2.3 Objetivos específicos

- a) Analisar o perfil de distribuição das mitocôndrias nas células do corpo gorduroso de ambas as castas por meio de microscopia de fluorescência com imunomarcagem da proteína intramitocondrial subunidade 5 α da ATP sintase;
- b) analisar as características ultra-estruturais das mitocôndrias do corpo gorduroso de ambas as castas por meio de microscopia eletrônica de transmissão;
- c) quantificar o número de unidades mitocondriais funcionais por meio de ensaio de atividade da citrato sintase;
- d) mensurar o consumo de oxigênio mitocondrial e controle respiratório das mitocôndrias por meio de respirometria de alta resolução;
- e) quantificar por meio de PCR em tempo real o nível de expressão de genes codificadores de fatores de transcrição controladores da biogênese mitocondrial;
- f) averiguar através da medição dos níveis de lactato se as células do corpo gorduroso estão sob efeito Warburg;
- g) mensurar a produção de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias do corpo gorduroso;
- h) analisar a expressão relativa de genes codificantes de enzimas antioxidantes por meio de PCR em tempo real;
- i) Averiguar o estado redox e estresse oxidativo das células do corpo gorduroso por meio de ensaios de medição dos níveis de proteína carbonilada e glutatona reduzida e oxidada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2 Coleta das larvas de *A. mellifera*

O corpo gorduroso foi dissecado de larvas de quarto e quinto estágio de desenvolvimento obedecendo a critérios classificatórios (**Tabela 1**) já descritos em literatura (6, 51). Nestes respectivos trabalhos as larvas de quarto instar (L4) antecedem o quinto estágio larval (L5), este último é composto por três estágios de crescimento dos quais a larva é ainda alimentada (F1, F2, F3) e três estágios de tecelagem de casulo (S1, S2, S3), durante os quais as larvas gradualmente esvaziam seus intestinos e se preparam para se tornarem pré-pupas (Tabela 1). É importante salientar que após a larva entrar no processo de tecelagem de casulo (*spinning phase*) a mesma cessa de se alimentar e, portanto se encontra com o destino diferencial já traçado para rainha ou operária. Dado que o nosso principal objetivo é entender os mecanismos de diferenciação nós focamos os esforços no principal período de alimentação diferencial L4 até as fases de alimentação (F1, F2 e F3), seguida pelo menos de pelo menos uma fase de tecelagem de casulo. É importante salientar que a ausência das análises das fases S2/S3 em experimentos envolvendo a aferições da concentração de lactato, análise da expressão de genes antioxidantes, medidas de proteína carbonilada bem como glutathione reduzida e oxidada das larvas se deve o fato dos resultados anteriores, já então publicados em periódico internacional como resultado desse trabalho (ver anexo b) revelaram pouca variação entre as fases de tecelagem de casulo.

Tabela 1. Tabela procedimental utilizada neste trabalho para classificação dos estágios larvais durante o desenvolvimento de rainhas e operárias de *A. mellifera*.

Instar	Estágio específico		Rainha	Operária
			Peso (mg)	
L4			3,8-44	4,2-32
L5	Principal fase de alimentação diferencial (<i>feeding phase</i>)	F1	35-90	29-60
		F2	91-180	61-110
		F3	181-260	111-160
L5	Fase de tecelagem de casulo (<i>spinning phase</i>)		Característica intestinal	
		S1	Intestino Cheio	
		S2	Intestino metade cheio e metade vazio	
		S3	Intestino vazio	

Favos de cria contendo larvas eram diretamente retirados para obtenção de larvas de operárias. Para obtenção das larvas de rainha, estas foram criadas por um procedimento apicultural padrão no qual larvas recém-eclodidas são transferidas para uma célula de cria contendo geleia real e reintroduzidas em colônias de abelhas híbridas africanizadas (*A. mellifera*) mantidas no apiário experimental do Departamento de Genética da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. Após determinado período de tempo, larvas de rainha eram retiradas das colônias, analisadas e classificadas segundo o período de desenvolvimento.

3.3 Análise da distribuição mitocondrial por imunofluorescência

O corpo gorduroso de larvas de rainha e operária de cada estágio de desenvolvimento ($n = 3$) foi dissecado e fixado em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (PBS) durante 16 h a 4 °C. Subsequentemente, as amostras foram lavadas em PBS e incluídas em meio Tissue Tek O.C.T (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e seccionadas a 14 μ M de espessura em criostato CM1850 (Leica, Wetzlar, Alemanha). As secções foram colocadas sobre lâminas revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a adesão, foram hidratados com PBS e Triton X-100 a 1% (PBST) durante 2 h, lavados com PBS e incubados durante 16 horas a 4 °C em anticorpo primário contra a subunidade 5 alfa da ATP sintase (anticorpo anti-ATP5 α produzido em camundongo, MitoSciences, # MS507, ABCAM, Cambridge, MA, EUA) diluído a 1: 500 em PBS contendo albumina de soro bovino (BSA) a 0,1%. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas em PBST e incubadas em anticorpo secundário (AlexaFluor-568 anti-camundongo de cabra, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) diluído 1: 1000 em PBS / BSA durante 1 h à temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram contra corados com DAPI e TRITC-faloidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para revelar núcleos e F-actina, respectivamente, e montados sobre lâminas em meio para microscopia de imunofluorescência (Fluoroshield Mounting Medium com DAPI, ABCAM, Cambridge, MA, EUA). As imagens foram obtidas em sistema de microscópio confocal TCS SP5 (Leica, Wetzlar, Alemanha) e analisadas utilizando o seu próprio software (Leica Application Suite AF 2.6.0 build 7266) e ImagePro-Plus (versão 4.5.0.29).

3.4 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras do corpo gorduroso de larvas de rainha e operária de cada estágio de desenvolvimento ($n = 3$) foram fixadas durante 2 h em glutaraldeído (2,5%) em tampão de

cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,1, contendo sacarose 0,3 M para controle osmótico). Após lavagens em tampão cacodilato 0,1 M, foram pós fixadas durante 2 h em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1 M e desidratadas numa série de etanol crescente (70% -100%). As amostras foram incluídas em resina de Araldite® 506 epoxy (A3183 Sigma) e após polimerização foram seccionadas a 80-90 nm em ultramicrotomo. As secções foram colocadas em grades de cobre e coradas com acetato de uranilo 1% e citrato de chumbo. As imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-100 CXII, Tóquio, Japão) foram processadas para ajustar contraste e brilho no software Photoshop CS6 e analisadas em ImagePro-Plus (versão 4.5.0.29).

3.5 Ensaio de atividade da citrato sintase

A atividade da citrato sintase foi medida para estimar números de unidades mitocondriais funcionais. Isto é importante porque as mitocôndrias variam amplamente em forma, tamanho e densidade de cristas internas. Assim, medindo um passo enzimático chave é um método mais preciso do que contar a densidade de seções para avaliar a função mitocondrial e dinâmica em estudos comparativos (52). O ensaio é baseado na conversão de oxaloacetato e acetil-CoA em citrato e SH-CoA e monitora colorimetricamente a produção de ácido tionitrobenzóico. As amostras de corpo gorduroso de larvas de rainha e operária (n = 4) foram incubadas em tampão de lise RIPA [NaCl 0,75 M, SDS 0,5%, Tris 0,25 M, Triton X-100 a 5%, EDTA suplementado com ortovanadato 100 mM, ácido sódico pirofosfato 100 mM, PMSF, 100 mM, leupeptina 1% (todos os reagentes da empresa Sigma, St. Louis, MO, EUA)], sonificados a 40 Hz durante 10 min e depois incubados em gelo. Dez microlitros dos lisados de cada amostra foram recolhidos e incubados em 200 µL de mistura reacional (Tris-HCl 50 mM, DTNB 100 µM, Triton X-100, pH 8, suplementado com 2,5 µL de oxaloacetato 250 µM e 2,5 µL de acetil- CoA 50 µM). A reação foi monitorizada durante 10 min em espectrofotômetro Cary 50 Bio® (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) a 412 nm e 37 °C. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína das respectivas amostras determinada por ensaio Bradford (53) e analisados no software GraphPrism V 5.0. As análises estatísticas foram realizadas por two-way ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (p <0,05).

3.6 Medições de consumo de oxigênio

Para as medições do consumo de oxigênio das células do corpo gorduroso de larvas de rainha e operárias foi utilizada a técnica de respirometria de alta resolução. Esta técnica

consiste em colocar um determinado tecido ou agregado celular nas câmaras fechadas de um aparelho denominado oxígrafo, sob agitação constante em meio de respiração por um determinado período de tempo. Há a presença de sensores que medem a concentração de oxigênio dentro da câmara e que pelo cálculo da derivação temporal desta concentração o software do fabricante devolve um gráfico da taxa respiratória da amostra em questão. A partir da introdução de substâncias específicas na câmara de reação é possível modular as taxas dos passos da fosforilação oxidativa mitocondrial, assim fornecendo dados sobre condições ou estados mitocondriais que permitem inferir sobre o controle do processo de fosforilação oxidativa.

Os ensaios de consumo de oxigênio foram realizados a 37 °C utilizando o aparelho Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). Para a aquisição dos dados foi utilizado o software DatLab (Oroboros), proveniente do próprio fabricante, configurado de modo a obter os dados em intervalos de tempo de 2 segundos, o que inclui o cálculo da derivação temporal da concentração de oxigênio, a deconvolução do sinal (dependendo do tempo de resposta do sensor de oxigênio) e a correção para o fluxo de oxigênio (54).

Larvas de rainha e operária (n= 6 para cada casta e fase de desenvolvimento) do quarto instar (L4), bem como das fases de alimentação (F1, F2 e F3) e tecelagem de casulo (S1, S2 e S3) do quinto instar larval tiveram o órgão do corpo gorduroso dissecado e amostras deste foram incubadas na câmara do aparelho oxígrafo, sob agitação constante, contendo 2,1 mL de tampão de respiração MiR05 (EGTA 0,5 mM, MgCl₂.6H₂O 3 mM, ácido L-lactobiônico 60 mM, taurina 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D –sacarose 110 mM, BSA 1 g/L) a 37 °C.

Foram determinadas as taxas respiratórias no estado Basal (R, *Routine*), no qual infere-se sobre a fosforilação oxidativa endógena sem adição de substrato ou moduladores mitocondriais. Após obtenção do registro do estado mitocondrial basal adicionou-se succinato 10 mM para medir a respiração ligado ao Complexo II (relacionado à CII, *CII-linked*), dado que o succinato é tido como fator limitante da reação de fosforilação oxidativa, já que é convertido em fumarato no domínio catálitico do complexo II, fornecendo energia para o bombeamento de prótons para o espaço intramitocondrial. Em seguida, para determinar o estado de fosforilação (P, *Phosphorylation*) adicionou-se ADP 220 μM, que pode ser considerado como o segundo fator limitante da produção de ATP mitocondrial. Em seguida foi adicionado oligomicina (1 μg/mL), que é tido com inibidor temporário da ATP sintase,

para estabelecer o estado não fosforilante, ou de fuga de elétrons por meio da membrana interna mitocondrial (L, *Leak*). Por fim foram adicionadas quatro doses sequenciais do protonóforo carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP) 1 μ M, para determinar o estado de capacidade máxima do sistema de transporte de elétrons (ETS, *electron transport system*) através do desacoplamento mitocondrial. Esta droga permite a passagem de prótons aprisionados no espaço intermembranar pela membrana interna da mitocôndria, fazendo com que a mitocôndria consuma quantidades máximas de oxigênio de modo a repor o gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP. Uma representação esquemática da sequência do ensaio e as medições reais tomadas durante uma sessão são mostradas na **Figura 5**.

Figura 5: Gráfico representativo do ensaio de respirometria de alta resolução.

Este gráfico mostra o tempo quando o tecido do corpo gorduroso foi inserido na câmara de reação, seguido pela adição sequencial das substâncias succinato, ADP + Pi, oligomicina e quatro doses de CCCP. Os estados respiratórios mitocondriais basal (R), ligado ao complexo II (CII), fosforilação (P), fuga de elétrons (L) e a capacidade máxima do transporte de elétrons (ETS, E), foram registrados sempre quando o fluxo de oxigênio atingiu um platô constante. Em seguida, o fármaco seguinte foi sequencialmente adicionado (setas). Esses dados foram utilizados para o cálculo do acoplamento mitocondrial (razão entre o estado de fuga de elétrons/ETS), fosforilação de desacoplamento (razão estado de fuga de elétrons/fosforilação), demanda fisiológica (relação entre estado basal/ETS), e bem como as razões respiração basal/fosforilação, relação CII/ETS e relação CII/fosforilação. A linha azul refere-se ao declínio da concentração de oxigênio dentro da câmara (eixo vertical esquerdo) e a linha vermelha ao fluxo de oxigênio (eixo vertical direito), indicando o oxigênio consumido pela amostra de tecido. O eixo horizontal representa a escala de tempo de cada experimento de 30 minutos.

Ao terminar a sessão de ensaio, o meio contendo o tecido foi recolhido com uma pipeta e transferido para tubos contendo 200 μ L de KOH 8M. Utilizaram-se três alíquotas de

1 µL cada para quantificar o teor de proteína total pelo método de Bradford (53). Os resultados da quantificação de proteína foram então utilizados para normalização das medições da função mitocondrial.

Após devidamente normalizados foram calculadas as razões de controle de fluxo (RCF), que são previamente determinadas pela literatura para entender o controle da fosforilação oxidativa por parte das mitocôndrias (55). Sendo assim nós calculamos as razões *Leak/ETS*, *Leak/Phosphorylation*, *Phosphorylation/ETS*, *Routine/ETS* e *CII-linked/ETS*. As razões *Leak/ETS* e *Leak/Phosphorylation* são derivadas do consumo de oxigênio do estado de vazamento de prótons pelo consumo da capacidade máxima de transporte de elétrons e estado de fosforilação. Ambas as razões são referências para indicar a eficiência mitocondrial. A razão *CII-linked/ETS* reflete o consumo de oxigênio pela fosforilação oxidativa controlada pelo complexo II em relação ao consumo de oxigênio pela capacidade máxima de transporte de elétrons. Por outro lado, a razão *Phosphorylation/ETS* reflete a limitação do sistema de fosforilação dada pela quantidade de oxigênio utilizado para produção de ATP em relação à capacidade máxima de transporte de elétrons. Por fim a razão *Routine/ETS* refere-se à demanda fisiológica mitocondrial por oxigênio, e informa sobre o estado fisiológico controlado pela demanda energética celular pela máxima capacidade de transporte de elétrons.

Tanto para averiguação dos estados mitocondriais como para o cálculo RCF a média e o desvio padrão para a rainha e operária foram calculados para cada fase de desenvolvimento e, após o teste de normalidade, foram analisados por two-way ANOVA ($p < 0,005$) e teste Bonferroni pós-hoc utilizando software GraphPrism V 5.0.

3.7 Análise de expressão gênica de genes de biogênese mitocondrial e enzimas antioxidantes

3.7.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Três amostras de corpo gorduroso de cada fase de desenvolvimento foram dissecadas e homogeneizadas em TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para extração de RNA de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração e a qualidade de RNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA) a 260/280 nm antes do tratamento com DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA,

EUA) para remover o DNA residual. O cDNA da primeira cadeia foi sintetizado por transcrição reversa utilizando a enzima Superscript II e primer Oligo (dT) 12-18 (ambos da Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

3.7.2 Primers

Os genes relacionados com a mitogênese foram identificados por alinhamentos BLASTP dos respectivos genes de *Drosophila* contra a base de dados de sequências preditas (Amel_OGS3.2) em *A. mellifera* (genoma, Amel 4.54.5). Sequências ortólogas foram identificadas para o Fator de Transcrição Mitocondrial A (*amTFAM*), Fator de Transcrição Mitocondrial B1, (*amTFB1*), Fator de Transcrição Mitocondrial B2, (*amTFB2*) e Receptor Relacionado com Estrogenio (*amERR*) e apresentados na **Tabela 2** com as suas respectivas sequências de primers. Primers candidatos foram identificados com auxílio da ferramenta PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e foram selecionados primers ancorados em dois exons diferentes, assim permitindo a detecção de eventual contaminação das amostras por DNA genômica.

A eficiência e especificidade dos primers foram verificadas por PCR em termociclador gradiente (PTC-200, MJ Research, Waltham, MA, EUA). Os produtos de PCR foram purificados (Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System, Promega, Madison, WI, EUA) e validados por sequenciamento Sanger. O sequenciamento foi efetuado utilizando o primer M13 em um analisador de genes automatizado ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com as dos genes de interesse anotados no genoma da *A. mellifera* utilizando o algoritmo BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e CodonCode Aligner (v 5.1.5).

Para o estudo do nível de expressão gênica de enzimas antioxidantes diretamente envolvidos na degradação e neutralização de radicais superóxido e H₂O₂, foram utilizados sequências de primers já descritos e validados (56). As sequências dos primers da superóxido dismutase dependente de manganês (amMnSOD), superóxido dismutase dependente de cobre-zinco (amCuZnSOD), glutatona peroxidase (Gtpx-1), catalase (amCat) e glutatona S-transferase 1 (amGst-1) encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sequências de primers usados para análise de expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial e enzimas do sistema antioxidante presentes em *A. mellifera*. Para cada genes são mostrados a função celular ao qual o gene está associado, o nome, os identificadores nos bancos de dados BeeBase e GenBank, o tamanho esperado do fragmento amplificado pelos primers. Como primers para o sistema antioxidante foram utilizados os da literatura (56). Os do gene *rp49* foram validados para normalização em ensaios RT-qPCR de *Apis melífera* (57).

Função	Nome do Gene	BeeBase	GenBank	Sequência do primer	Tamanho do amplificado (bp)
Biogênese mitocondrial	<i>amTFAM</i>	GB43084	XM_624015.4	F: 5'-CAAGTTTACAGCCCGCAACC-3' R: 5'-GCGTTTGTGTTGCTGTGGA-3'	166
	<i>amTFB1</i>	GB53915	XM_001121333	F: 5'-TGTAATGGCACAAGCGTGGA -3' R: 5'-CAAGACCGACATCAACTTTTGGT -3'	92
	<i>amTFB2</i>	GB44671	XM_001122259.3	F: 5'-TCAATTTTTGGCATTTTATTCGACA-3' R: 5'-CACATCCAGGAAGTACTTTTTTCCA-3'	87
	<i>amERR</i>	GB44544	NM_001162516.1	F: 5'-CTTTGCCTAGTCTGCGGTGA-3' R: 5'-ATCTCACACTCCCCATTCGC-3'	93
Antioxidantes	<i>amMnSOD</i>	GB45099	NM_001178048.1	F: 5'-GGTGGTGGTCATTTGAATCATTC-3' R: 5'-AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC-3'	78
	<i>amCuZnSOD</i>	GB47880	NM_001178027.1	F: 5'-GTCGTTCCGTGTAGTCGAGAA-3' R: 5'-TCCTTTGACTTCACCCTGAAGA-3'	73
	<i>amGst-1</i>	GB50265	NM_001178028.1	F: 5'-TGCCGATCGATTTTTATCAACTT-3' R: 5'-AGCCGTCAACGCAACTGC-3'	62
	<i>amCatalase</i>	GB41427	NM_001178069.1	F: 5'- TGGAGCAAGTCCTGATAAAATGC-3' R: 5'- TGGGCCAAGACGATGTCTATG-3'	76
	<i>amGtpx</i>	GB47478	NM_001178021.1	F: 5'-CGACAACTATAAGGAAGCGAAA-3' R: 5'-AGATAGAAAAACGTCTTCGCCT-3'	76
	<i>rp49</i>	GB47227	AF441189.1	F: 5'-CGTCATATGTTGCCAACTGGT-3' R: 5'-TTGAGCACGTTCAACAATGG-3'	150

3.7.3 Ensaio de reação em cadeia da polimerase tempo real (RT-qPCR)

As análises quantitativas por RT-PCR (RT-qPCR) foram feitas utilizando 1,5 µL de cDNA (diluído 1:10), 7,5 µL de Power SYBR® PCR Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µL de cada primer (10 pmol/mL) e 5 µL de água deionizada (MilliQ, Millipore, Billerica, MA, EUA) completando um volume final de 15 µL. As reações foram realizadas em aparelho de PCR em Tempo Real StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) nas seguintes condições: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min, seguido de análise da curva de dissociação (95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min e 95 °C durante 15 s). Para normalização das amostras biológicas, foram realizados ensaios utilizando o gene *rp49* de *A. mellifera* que codifica a proteína ribossomal RP49, também designada por RPL32. A sua adequação como gene de controle endógeno em análises de RT-qPCR de *A. mellifera* foi estabelecida (57) e o mesmo foi utilizada em vários trabalhos anteriores para ensaios da expressão de genes em nosso laboratório (8, 16, 22).

3.7.4 Cálculo de expressão relativa

Cada uma das três amostras biológicas por fase de desenvolvimento foi analisada em triplicata. Os níveis relativos de transcrição foram calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (58) utilizando uma das amostras de quarto instar de larval de operárias como calibrador para cada gene analisado. Para os genes relacionados ao sistema antioxidante o cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ seguiram o mesmo *threshold* de modo a viabilizar uma análise comparativa mais aprofundada entre os genes. Para análise estatística os genes relacionados biogênese mitocondrial tiveram os seus valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ log10 transformados de modo a obter homogeneidade da variação necessário para testes estatísticos paramétricos. Para os genes relacionados ao sistema antioxidante tal transformação não foi necessária. Após isso todos os dados foram submetidos a teste estatístico two-way ANOVA ($p < 0,05$) e testes pós-hoc de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism V 5.0 (Jandel Scientific, San Diego, CA, EUA).

3.8 Medição dos níveis de lactato

Três amostras biológicas de corpo gorduroso de cada casta e fase larval foram dissecadas, maceradas mecanicamente com auxílio de pistilo e separado em duas alíquotas de 500µL cada. A primeira alíquota foi ultracentrifugada a 12.000 x g em microtubos de retenção para proteína com peso maior que 10 kDa (Vivaspin 2 10000 MWCO PES, GE Healthcare). As amostras foram então incubadas em placas de ensaio de 96 poços utilizando o kit específico de lactato (MAK064, Sigma). O ensaio seguiu o protocolo fornecido pelo fabricante e a leitura de absorbância foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro (PowerWaveX Bio-Tek Instruments, Inc). A curva padrão foi construídas em passos de diluição 1:10 utilizando reagentes para do próprio kit. A segunda alíquota foi submetida ao teste de Bradford (53) para medição do conteúdo de proteínas e utilizada para a normalização dos dados de lactato. Após isso os dados foram submetidos a teste estatístico two-way ANOVA ($p < 0,05$) e teste pós-hoc de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism V 5.0.

3.9 Medição dos níveis de peróxido de hidrogênio

Três amostras de corpo gorduroso das fases L4 até a S1 de ambas as castas foram dissecados e colocados em 2 mL de tampão de respiração MiR05 (20 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 110 mM sucrose, 20 mM taurine, 60 mM K-lactobionato, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl_2 , 1 g/L de albumina de soro bovino livre de ácido graxos, pH 7.1) a 37 °C, seguida da adição de 4 µL de Peroxidase de Rábano (0.1 U/mL) e 2 µL de Amplex® Red Hydrogen Peroxide 50 µM do Peroxidase Assay Kit (cat. A22188, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após determinado tempo adicionou-se 40 nM de piruvato à reação. A reação foi incubada em espectrofotômetro de fluorescência Hitachi Modelo F-4500 (Hitachi Ltd., Tóquio, Japão) sob excitação e emissão de 530 e 560 nm, respectivamente, com agitação constante durante 10 min. Dentro deste intervalo de tempo o aparelho fornece uma curva de fluorescência por tempo, geralmente acendente durante os primeiros minutos da reação mas após determinado tempo estabilizando e atingindo um platô. Os dados foram normalizados pela quantidade total de proteína pelo método de Bradford (53). A adição sequencial de peróxido de hidrogênio (10 µM) foi utilizada para montar a curva padrão. Os dados obtidos foram submetidos a teste estatístico two-way ANOVA ($p < 0,05$) e testes pós-hoc de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism V 5.0. Destes dados foram construídos dois gráficos:

um de produção endógena de peróxido de hidrogênio e outro de produção dessa mesma espécie reativa de oxigênio sob estímulo de piruvato 40 nM.

3.10 Medida dos níveis de proteína carbonilada e níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

Proteína carbonilada e níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram avaliadas a partir do mesmo homogeneizado de corpo de gorduroso de cinco amostras de larvas de rainha e de operárias (fase L4 a fase S1) em tampão Tris-HCl 0,1 M frio (pH 7,4), centrifugadas a 1.500 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante contendo as proteínas foi recolhido. Alíquotas de cada amostra foram submetidas a medição da quantidade de proteínas pelo método de Bradford (53) para posterior normalização. A partir do restante do homogeneizado foram separadas duas alíquotas, a primeira destinada à medição dos grupos carbonilados e a segunda a medição de GSH e GSSG. Os dados de proteína carbonilada e GSH/GSSG foram analisados estatisticamente por two-way ANOVA ($p < 0,005$) e teste post-hoc Bonferroni utilizando o software GraphPad© Prism 5.01 (San Diego, CA, EUA), que também foi utilizado para preparar os gráficos.

3.10.1 Proteína Carbonilada

A medição dos grupos de proteína carbonilada baseou-se no trabalho de Reznick e Packer (59). Para tal foram recolhidos 75 uL da alíquota e colocado em 1 mL de HCl 2,5 M, como controle negativo do protocolo e outros 75 uL de alíquota colocado em 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH). Ambas foram incubadas a 37 °C por 60 min em ambiente escuro. Em seguida foram adicionados 4 mL de ácido tricloroacético 10%, mantido em gelo por 10 min e centrifugados posteriormente a 5.000 x g, por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra lavada com 1 mL de solução etanol: acetato de etila (1:1) e centrifugada novamente a 5.000 x g, por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. Esse processo de lavagem foi repetido 3 vezes e o último descarte do sobrenadante foram adicionados 1 mL de solução de guanidina 6 M e a amostra mantido por 40 min sob agitação constante. Os grupos de proteína carbonilada foram avaliados por espectrofotometria a 340 nm em placa de 96 poços em espectrofotômetro Cary 50MPR (Varian Ltd., Melbourne, Austrália) e normalizados pela quantidade de proteína de cada amostra averiguada anteriormente.

3.10.2 Relação GSH/GSSG

Para o cálculo da relação GSH/GSSG foram medidas a quantidade de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) separadamente a partir da segunda alíquota proveniente do homogeneizado obedecendo ao método de Hissin e Hilf (60). A cada uma das alíquotas foi adicionado 100 µL de TCA 30% seguido de centrifugação a 2.000 x g por 10 min a 4 °C e descarte do sobrenadante. Para análise de GSG foram adicionados 1,020 mL de tampão de sódio (sódio 100 mM, EGTA 6 mM, pH 7,4) e 100 µL de orto-fitalaldeído (OPT) 1% seguido da incubação por 15 min protegido da luz. Para análise de GSSG foram adicionados 500 µL do mesmo tampão fosfato de sódio e 40 µL de NEM (N-Etilmaleimida 2 mM) por 30 min. Em seguida foram adicionados 500 µL de NaOH 1 M junto com 100 µL de OPT 1% e incubação por 15 min protegido da luz. As alíquotas foram lidas separadamente em triplicata experimental em placa de 96 poços sob excitação/emissão de 350/420 nm, em espectrofotômetro Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). Para ambos os testes o controle negativo da leitura foi feito em placa contendo todos os reagentes sem a presença de material biológico. A curva padrão foi obtida utilizando concentrações já conhecidas de GSH 1,5 mg/mL e GSSG 5mg/mL em série decrescente de diluição (1:10). Os dados de GSH e GSSG de cada amostra foram normalizados pela respectiva quantidade de proteína averiguada anteriormente e realizado o cálculo da razão GSH/GSSG para cada amostra.

4 RESULTADOS

4.1 Densidade mitocondrial, distribuição e morfologia das mitocôndrias do corpo gorduroso larval

Para obter uma visão geral sobre a densidade e distribuição das mitocôndrias em células de corpo gorduroso de larvas de quarto e início de quinto instar de rainha e operárias marcou-se a subunidade ATP5 α da ATP sintase de mitocôndrias com um anticorpo comercial. Estes estágios de desenvolvimento foram escolhidos devido ao fato de que eles representam a transição de um estágio ainda casta flexível, como no caso do quarto instar larval, para um estágio não flexível no decorrer da fase de alimentação do quinto instar larval, no qual a larva já se encontra comprometida em desenvolver-se em determinado tipo de casta específico (61). Apesar do destino da casta já estar comprometido nas fases F1-F3 do quinto instar nós estendemos estas análises para as fases sequenciais de tecelagem de casulo, que marcam a transição para os processos da metamorfose.

Os resultados mostraram trofócitos com extensas redes mitocondriais em ambas as castas (**Figura 6**). Durante o quarto instar larval a rede mitocondrial nos trofócitos ainda é bastante similar entre as duas castas, mas depois parece diminuir gradualmente em larvas de operárias assim que estas entram no quinto instar de desenvolvimento, especialmente na região perinuclear. Uma forte redução na densidade mitocondrial foi especialmente perceptível quando as larvas de operárias param de se alimentar e entram no estágio de tecelagem de casulo. Por outro lado, as larvas de rainha apresentam redes mitocondriais mais concentradas durante os estágios de alimentação.

Esses achados foram amplamente corroborados pelas análises ultraestruturais do corpo gorduroso larval, que agora oferecem muito mais detalhes sobre a densidade, distribuição e forma mitocondrial. Conforme mostrado na **Figura 7**, durante o quarto instar larval, os trofócitos do corpo gorduroso de larvas de rainha são muito mais ricos em mitocôndrias do que os trofócitos de larvas de operárias, indicando assim que esses elementos-chave de regulação metabólica já diferem antes que o destino de casta se torne totalmente fixo. Além disso, as mitocôndrias de ambas as castas apresentam alta concentração de cristas mitocondriais, o que resulta em organelas bastante eletrodensas conforme vistas nas imagens.

Durante o desenvolvimento das larvas no início do quinto estágio, representadas na **Figura 7** pelos três estágios de alimentação sequenciais (*feeding*), as diferenças se tornaram

mais intensas. Observou-se uma intensa concentração de unidades morfológicas mitocondriais em larvas de rainha na área perinuclear bem como no citoplasma, circundando vesículas de acúmulos lipídicos e proteicos. Em contraste, larvas de operárias também apresentam aumento das vesículas lipídicas porém o número de unidades morfológicas mitocondriais aparentemente não acompanha esse aumento e não se apresenta elevado.

Embora as diferenças entre as castas no perfil mitocondrial já estivessem bem estabelecidas durante a fase de crescimento do quinto estágio larval, estendemos a investigação da morfologia ultraestrutural das mitocôndrias de trofócitos do corpo gorduroso para a fase de tecelagem casulo (*spinning*). Estas fases são marcadas pela expressiva diferenciação já que nesse momento de desenvolvimento as diferenças se tornaram realmente aparentes nas imagens de imunofluorescência. A **Figura 8** mostra as comparações entre as castas para os três estágios em que a larva cessa a alimentação e tece o casulo no interior da célula de cria. Vale ressaltar que a alta densidade mitocondrial persistiu no citoplasma perinuclear das rainhas, em contraste com a mesma região em operárias. Apesar disso, os acúmulos de grânulos proteicos são aparentemente semelhantes em ambos as castas analisadas.

Além da região perinuclear examinamos mais de perto o segundo local de agregados mitocondriais, a área logo abaixo da membrana plasmática (**Figura 9**). Interessantemente, parece não haver grande diferença entre as castas em termos de densidade mitocondrial nesta área, possivelmente devido ao papel dessas mitocôndrias no fornecimento de energia para processos de transporte de nutrientes e metabólitos através da membrana plasmática dos trofócitos. Isto também é evidenciado pela estreita associação das mitocôndrias com o sistema reticular da membrana plasmática. Foi também observada uma estreita associação com outro sistema de membrana intracelular, o retículo endoplasmático perinuclear (**Figura 10**).

Em termos de diferenças específicas de casta na morfologia mitocondrial, um achado digno de nota é o aparecimento de mitocôndrias em forma de cálice em trofócitos de larvas de rainha quinta-instar da fase de alimentação (**Figura 11**). Quando observadas em maior aumento essas mitocôndrias aparecem em forma de anel em seções transversais sequenciais e, em reconstrução tridimensional ganhariam o formato de cálice. Estes contêm grânulos de glicogênio no interior conjuntamente com uma porção de citoplasma.

As duas técnicas de obtenção de imagens empregadas até o momento (imunofluorescência através da marcação da subunidade 5 α da ATP sintase e secções de microscopia eletrônica de transmissão) proporcionaram informações importantes sobre a distribuição, morfologia e densidade das mitocôndrias. Tais técnicas são essencialmente de natureza qualitativa, especialmente para mitocôndrias que são altamente variáveis em tamanho e densidade das cristas mitocondriais. Além disso, as mitocôndrias formam redes altamente dinâmicas acompanhadas por processos de biogênese e mitofagia bem como fusão e fissão mitocondrial (41). Deste modo, utilizou-se um ensaio bioquímico para obter dados sobre o número de unidades funcionais mitocondriais presentes no corpo de gorduroso de larvas de rainha e operárias. A análise da atividade da citrato sintase que permite isso mostrou que larvas de rainhas têm um número significativamente maior de unidades funcionais mitocondriais, notoriamente apresentando um pico destas unidades durante a fase de crescimento no quinto instar (F2 e F3) (**Figura 12**). Em seguida, as unidades mitocondriais funcionais passam por uma drástica diminuição numérica durante o estágio de tecelagem de casulo (S1 a S3), período no qual ambas as castas apresentam níveis baixos e semelhantes. Apesar de não ser estatisticamente significativa, a atividade média de citrato sintase já é mais elevada em larvas de rainha desde o quarto instar de desenvolvimento quando comparadas com as larvas de operárias de mesmo período.

Junto aos resultados da microscopia de luz e eletrônica, que já apontarem para uma grande diferença entre as castas, o ensaio de citrato sintase permitiu observar que as unidades mitocondriais funcionais realmente aumentam apenas nas rainhas durante as fases desenvolvimento e que, por outro lado, larvas de operárias apresentam níveis basais sem grandes aumentos.

Figura 6: Imagens de microscopia laser confocal do perfil mitocondrial de trofócitos do corpo gorduroso no desenvolvimento das castas de *Apis mellifera*.

Imagens de microscopia confocal mostrando o perfil mitocondrial de trofócitos de rainha (coluna esquerda) e operárias (coluna direita) durante o desenvolvimento de castas de *Apis mellifera*. As mitocôndrias foram identificadas através da marcação da subunidade ATP5 α da ATP sintase com anticorpo comercial (verde). Os núcleos corados com DAPI são azuis e a F-actina revelada por marcação com TRITC-faloidina é vermelha. São mostradas larvas de quarto estágio (L4) e fases sequenciais da alimentação (F1, F2 F3) e de tecelagem de casulo do quinto estágio larval (S1; S2 / S3). Escala as barras: 10 μ m.

Figura 7. Micrografias ultraestruturais de trofócitos de corpo gorduroso de larvas de rainha e de operária no quarto instar larval e nos estágios de alimentação do quinto instar larval.

As micrografias ultraestruturais representam trofócitos de corpo gorduroso de larvas de rainha (coluna à esquerda) e de operária (coluna à direita) no quarto instar larval (L4) e nos estágios sequenciais de alimentação do quinto instar larval (F1, F2 e F3). Os trofócitos de rainhas apresentam uma maior densidade de unidades morfológicas mitocondriais do que os de trofócitos de operárias, especialmente na área perinuclear. Além do número superior, as mitocôndrias dos trofócitos de rainhas também têm cristas de alta densidade e são frequentemente cercadas por retículo endoplasmático. Grânulos de glicogênio (Gl), vesícula lipídica (L), mitocôndria (M), grânulo multivesicular (Gm), grânulo proteico (G), núcleo (N), traquéia (T); mitocôndrias em forma de cálice (*) Escala das barras: 2 μ m.

Figura 8. Micrografias ultraestruturais de trofócitos de corpo gorduroso de larvas de rainha e de operária nos estágios de tecelagem de casulo.

As micrografias ultraestruturais representam trofócitos de corpo gorduroso de larvas de rainha (coluna à esquerda) e de operária (coluna à direita) nos estágios sequenciais de tecelagem de casulo (S1, S2 e S3). Vesícula lipídica (L), mitocôndria (M), grânulo multivesicular (Gm), grânulo proteico (G), núcleo (N). Escala das barras: 2 µm

Figura 9: Detalhes ultraestruturais da região próxima à membrana plasmática de trofócitos de corpo gorduroso de larvas de quinto instar de operárias e rainhas.

Detalhes ultraestruturais do trofócitos de corpo gorduroso de larvas de quinto instar de operárias e rainhas demonstrando agregados mitocondriais abaixo da membrana plasmática. Espaço entre as células (E), vesículas lipídicas (L), mitocôndria (M), membrana plasmática (MP), sistema reticular da membrana plasmática (S). Escala das barras: 2 μ m.

Figura 10: Imagens ultraestruturais de alta resolução de corpo gorduroso de imagens de trofócitos de larvas de operária demonstrando mitocôndrias envolvidas por membranas.

As imagens de alta resolução acima apresentam regiões dos trofócitos do corpo gorduroso de larvas de operária onde as mitocôndrias são envolvidas por membranas do retículo endoplasmático na região perinuclear (A) e pelo sistema reticular da membrana plasmática abaixo da membrana plasmática (B). Espaço extracelular (E), vesícula lipídica (L), mitocôndria (M); sistema reticular da membrana plasmática (S). Escala da barras: 2μm.

Figure 11: Mitocôndrias em forma de cálice.

Este fenótipo (*) foi exclusivamente observado em trofócitos de larvas de rainhas. Nas secções transversais cada mitocôndria aparece em forma de anel com um espaço interno preenchido com grânulos de glicogênio (Setas). Escala da barra: 2μm.

Figura 12. Quantificação de unidades mitocondriais funcionais por ensaio de citrato sintase em tecido de corpo gorduroso de larvas de rainha e operárias durante o desenvolvimento de castas de *A. mellifera*.

As estimativas foram calculadas através do ensaio enzimático da atividade da citrato sintase. As barras representam a média e desvio padrão da média de quatro repetições por cada estágio de desenvolvimento e casta. A análise por two-way ANOVA seguida por teste de Bonferroni revelou diferenças altamente significativas para os estágios F2 e F3 de alimentação do quinto estágio larval (***) $p < 0,001$.

4.2 Consumo mitocondrial de oxigênio e controle do fluxo mitocondrial

Os dados provenientes da imunofluorescência, microscopia eletrônica e ensaio de citrato sintase nos fornecem informações importantes sobre a densidade mitocondrial, distribuição e morfologia das mitocôndrias do corpo gorduroso larval, porém não fornecem dados a respeito da funcionalidade das mitocôndrias. Deste modo, a fim de obter uma visão mais aprofundada sobre a funcionalidade mitocondrial no tecido do corpo gorduroso de larvas de rainha e operária, monitoramos o consumo de oxigênio usando uma metodologia denominada respirometria de alta resolução. Esta permite não só a averiguação do consumo de oxigênio por parte do tecido, bem como inferir sobre a fosforilação oxidativa e o controle desta por parte das mitocôndrias através de cálculos específicos. A representação gráfica mostrada na **Figura 5** da seção Materiais e Métodos mostra um exemplo da metodologia empregada e deve facilitar a compreensão e interpretação dos resultados obtidos.

O primeiro passo do ensaio denominado Basal (*Rotine*) é caracterizado como o primeiro platô representando o consumo de oxigênio basal, observado logo após a adição do

tecido do corpo gorduroso à câmara de reação do oxígrafo, ainda sem adição de moduladores químicos à câmara de reação. Logo de início, as medições revelaram um consumo (fluxo) de oxigênio basal significativamente maior nas rainhas para três dos sete estágios de desenvolvimento analisados (**Figura 13A**). Para os passos de ensaio subsequentes ligado ao Complexo II (*CII-linked*), Fosforilação (*Phosphorylation*), Fuga de elétrons (*Leak*) e máxima capacidade do transporte de elétrons (*ETS*), as diferenças entre os estados mitocondriais das amostras da rainha e de operárias tornaram-se ainda mais pronunciadas, especialmente nos estágios de alimentação do quinto instar (**Figura 13B-E**). A **Figura 14** mostra os mesmos dados, mas a partir de uma perspectiva diferente. Aqui, a sequência de estados mitocondriais é representada separadamente para cada estágio de desenvolvimento, pondo novamente em evidência a alta resposta das mitocôndrias da rainha em decorrência a adição sequencial dos moduladores do estado mitocondrial.

As taxas elevadas de consumo de oxigênio observadas nas mitocôndrias do corpo gorduroso da rainha no estado de respiração basal (*rotine*) (**Figura 13A**), nas quais a respiração depende apenas do substrato mitocondrial endógeno e, em seguida, do estado ligado ao complexo II (*CII-linked*), suportado pelo succinato, principal fator limitante da fosforilação oxidativa, (**Figura 13B**) refletem uma alta demanda de ATP celular. Por outro lado, quando é adicionado ADP+Pi, o segundo limitante da fosforilação oxidativa mitocondrial, os altos níveis observados no estado de fosforilação (*Phosphorylation*) em larvas de rainha indicam a capacidade superior de fosforilação oxidativa das mitocôndrias desta casta (**Figura 13C**). No estado de vazamento de prótons, denominado de *Leak*, (**Figura 13D**), a droga oligomicina bloqueia a porção Fo da ATP sintase, impedindo temporariamente a passagem de prótons e a fosforilação do ADP em ATP. Sendo assim, o consumo elevado de O₂ observado em rainhas poderia refletir desacoplamento intrínseco da fosforilação oxidativa, como o causado por um vazamento de prótons através da membrana interna da mitocôndria. Finalmente, a cadeia respiratória mitocondrial das células do corpo de gorduroso da rainha atingiu taxas muito elevadas para o estado máximo de transferência de elétrons (*ETS*), mostrado na **Figura 13E**. Isto foi promovido pelo protonóforo CCCP, substância que permite o retorno dos prótons de volta à matriz, acelerando assim a transferência de elétrons e o consumo de O₂ para a taxa máxima possível para cada amostra de preparação mitocondrial do corpo gorduroso.

Adicionalmente foram calculadas as razões de controle de fluxo (RCFs) para os diferentes estados mitocondriais durante os estágios de desenvolvimento correspondentes (**Figura 15 e Tabela 3**). Estas razões fornecem informações sobre o controle respiratório das mitocôndrias. Deste modo, quando o estado de vazamento de prótons foi calculado como uma fração dos estados de máxima capacidade de transporte de elétrons e Fosforilação (*Leak / ETS* ou *Leak / Phosphorylation*, respectivamente, **Figuras 15A, B**), encontramos razões muito semelhantes para rainhas e operárias, indicando graus semelhantes de acoplamento para estes estados mitocondriais nas duas castas. A relação *Leak / ETS* também revelou que cerca de 40% da capacidade máxima de consumo de O₂ está relacionada com o processo de *Leak* ou vazamento de prótons (**Tabela 3**), enquanto que a relação *Phosphorylation / ETS* indica que a capacidade do sistema de fosforilação é de 50-70% da capacidade *ETS* em ambas as castas (**Figura 15C, Tabela 3**). Além disso, o cálculo do RCF para os estados *Routine/ETS* e *CII-linked/ETS* (**Figura 15D, E, Tabela 3**) permitiu concluir que a demanda de ATP celular no corpo de gorduroso da rainha requer apenas cerca de 40% da capacidade máxima de ETS, enquanto as larvas de operárias usariam cerca de 60% da sua capacidade.

Tabela 3: Comparação das médias das razões de controle de fluxo entre larvas de rainha e operárias

Razão de Controle de Fluxo	Operária (Média ± Desvio padrão)	Rainha (Média ± Desvio padrão)
Leak/ETS	0.4317 ± 0.08676	0.4325 ± 0.03699
Leak/Phosphorylation	0.6143 ± 0.1137	0.7105 ± 0.1279
Phosphorylation/ETS	0.7137 ± 0.08434	0.6272 ± 0.1085
Routine/ETS	0.6064 ± 0.1212	0.4132 ± 0.09123
CII-linked/ETS	0.6101 ± 0.1169	0.4539 ± 0.05439

Quando cada estado respiratório mitocondrial foi observado separadamente durante o desenvolvimento das larvas (**Figura 13A-E**), foi possível observar que o corpo de gorduroso da rainha atinge um pico de capacidade respiratória durante os estágios de alimentação, principalmente em F2, seguido de uma diminuição na fase de tecelagem de casulo, fase na qual as larvas se preparam para a metamorfose. Em contraste, as mitocôndrias de operárias mantêm essencialmente o nível respiratório do quarto instar ao longo dos estágios de alimentação do quinto instar. No entanto, estes níveis diminuem durante o estágio de tecelagem de casulo. Em conjunto, esses resultados fornecem fortes evidências de que as larvas de rainha têm um conteúdo mitocondrial elevado e um maior consumo de O₂ em

estágios de desenvolvimento críticos para a diferenciação de castas, enquanto a qualidade mitocondrial, como revelado pela análise dos RCFs mitocondriais, é aparentemente similar entre as duas castas.

Figura 13. O consumo de oxigênio do corpo gorduroso de larvas de rainhas e operárias em relação à adição sequencial de moduladores da função mitocondrial.

Os gráficos acima representam o consumo de oxigênio do corpo gorduroso de larvas de rainhas e operárias sob a adição sequencial de moduladores da função mitocondrial. A) O fluxo basal de oxigênio foi medido após a inserção do tecido na câmara de reação, B) medida após adição de succinato (*ligado ao complexo II*), C) na presença de ADP (*fosforilação*), D) após a adição de inibidor da ATP sintase, oligomicina (*vazamento de prótons*), e E) CCCP, o desacoplador do sistema de transporte de elétrons que confere a máxima capacidade de transporte ao sistema mitocondrial (*ETS*). O eixo horizontal em cada gráfico mostra a respectiva fase de desenvolvimento. Os pontos de dados são médias e desvio padrão da média (n = 6). As diferenças estatísticas entre as duas castas foram testadas por two-way ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Figura 14: Consumo de oxigênio pelas mitocôndrias do corpo gorduroso de larvas de rainha e operária do quarto e quinto instar.

Os gráficos acima representam o consumo de oxigênio (fluxo) por mitocôndrias do corpo gorduroso de larvas de rainha e operária separados por estágios de desenvolvimento: quarto instar (A) e nas etapas sequenciais do quinto instar (B-G). O fluxo de oxigênio é mostrado após a inserção do tecido dentro da câmara e estabilização da respiração (substrato endógeno), bem como após estimulação por succinato, na presença de ADP+Pi, na presença do inibidor de ATP sintase, oligomicina, e quatro adições sequenciais do desacoplador CCCP. Nenhuma diferença estatística foi encontrada para larvas de rainha e operária do quarto instar. Nas três fases de alimentação F1, F2 e F3 (B-C) e etapas de tecelagem do casulo S1, S2 e S3 (E-G) do quinto instar larval, rainhas mostraram um maior consumo de oxigênio em resposta aos reagentes adicionados. Two-way ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 15: Razões de controle de fluxo dos estados mitocondriais.

Os gráficos acima representam as razões de controle de fluxo (RCFs) calculadas para corpo gorduroso de larvas de rainha e operária em estágios sequenciais de desenvolvimento. RCFs fornecem informações sobre o controle respiratório independente do conteúdo mitocondrial e tamanho celular. Nesta figura são mostradas as taxas de controle de fluxo para os estados mitocondriais vazamento de prótons - *Leak* (A), acoplamento fosforilativo - *phosphorylation coupling* (B), capacidade fosforilativa do sistema - *phosphorylation system* (C), capacidade relacionada ao complexo II (*CII-linked*) (D) e estado Basal (*routine*) (E). Two-way ANOVA com correção do teste de Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.3 Expressão de genes candidatos relacionados à biogênese mitocondrial

Inicialmente nossa intenção era investigar a expressão de um homólogo do gene *spargel* em larvas de abelhas. Spargel e seu homólogo em mamífero PGC1 α é um importante fator de transcrição que controla a biogênese mitocondrial. Entretanto, como não conseguimos identificar um homólogo da proteína Spargel no genoma de *A. mellifera*, decidimos investigar a expressão de outros genes candidatos relacionados à biogênese mitocondrial, como *amTFAM*, *amTFB1*, *amTFB2* e à regulação nutricional, com *amERR* (**Figura 16**). As médias dos níveis de transcrição de *amTFAM* foram maiores nas larvas de rainha durante os estágios iniciais e diminuíram posteriormente (**Figura 16A**), mas não foi encontrada diferença estatística entre as duas castas. Já para os outros três fatores os níveis de expressão foram significativamente maiores nas rainhas durante pelo menos um dos três estágios de alimentação, sendo o *amTFB1* fortemente superexpresso no estágio F2 (**Figura 16B**) e o *amERR* no estágio F1 das rainhas. O terceiro gene, *amTFB2*, se mostrou continuamente mais expresso (2-4 vezes) no corpo de gorduroso de larvas do quinto instar (**Figura 16D**), mostrando que a expressão dos genes relacionados com mitogênese e regulação nutricional anda de mãos dadas com o aumento do número mitocondrial e consumo de oxigênio em larvas de rainha.

Figura 16. Níveis de expressão dos transcritos de fatores relacionados à mitogênese e regulação nutricional.

Os quatro gráfico acima representam os níveis de expressão transcritos dos quatro fatores relacionados à mitogênese e controle nutricional no corpo gorduroso de larvas de rainhas e operárias. Quantificação relativa da expressão de *amTFAM* (A), *amTFB1* (B), *amTFB2* (C) e *amERR* (D) por RT-qPCR. Nesta figura são mostradas as médias e o erro padrão da média de três amostras biológicas por cada estágio e casta, cada uma analisada em triplicata. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (58) usando a expressão de *rp49* para a normalização e uma amostra do quarto instar larval de operária como calibrador para cada gene analisado. Para inferência estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA e o teste pós-hoc Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.4 Medida dos níveis de lactato

Como dito na introdução, o efeito de hipóxia pode ter associação com o efeito Warburg que desvia o metabolismo celular da fosforilação oxidativa para a rota glicolítica e possui como efeito a alta produção lactato, devido ao estímulo da lactato desidrogenase via HIF α . Sendo assim, foram testados os níveis de lactato endógenos presentes no corpo gorduroso durante o desenvolvimento das castas de *A. mellifera* (Figura 17). Através dos níveis de lactato pode-se inferir sobre a indução do processo da glicólise aeróbica nas células.

Curiosamente, os resultados mostram que as células do corpo gorduroso de larvas de rainhas e de operárias aparentemente produzem a mesma quantidade de lactato: operária $17,98 \text{ pmol}/\mu\text{g} \pm 21,95$ e rainhas $15,27 \text{ pmol}/\mu\text{g} \pm 9,58$ (média $\pm$ desvio padrão). Entretanto, enquanto as células de corpo de gorduroso de larvas de operárias apresentam variações apenas modestas nos níveis de lactato durante o desenvolvimento, o mesmo tecido em larvas de rainha não segue este padrão, mostrando uma diminuição significativa nos níveis de lactato durante a transição de quatro para o quinto instar larval (**Figura 17**).

Figura 17. Concentração de lactato no tecido do corpo gorduroso durante o desenvolvimento de larvas de rainhas e operárias de abelhas melíferas.

Os níveis de lactato foram normalizados pela concentração de proteína de cada amostra analisada. Nesta figura são mostradas as médias e o erro padrão da média de quatro amostras biológicas por cada estágio e casta, cada uma analisada em triplicata. Para inferência estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA e Bonferroni pós-hoc.

4.5 Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e expressão de genes antioxidantes

As diferenças quanto à densidade, número, morfologia bem como funcionalidade mitocondrial abrem margem para o estudo de outros processos metabólicos que poderiam afetar o desenvolvimento de castas em resposta à alimentação diferencial. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são potenciais candidatos à resposta ao programa de alimentação diferencial e podem afetar o desenvolvimento larval devido ao estresse oxidativo e ao papel

de sinalização. Assim, a maior densidade mitocondrial observada durante o desenvolvimento da larva de rainha poderia implicar em maior produção de ROS. A fim de obter testar essa hipótese, quantificamos a produção de H_2O_2 por método fluorimétrico Amplex red/ Peroxidase. Os resultados mostraram que as larvas de rainhas e operárias não apresentam grande variação na produção de H_2O_2 , apresentando níveis apenas duas vezes superiores na produção de H_2O_2 em algumas fases larvais de rainha (F1 e F3), mas sem diferença estatística (**Figura 18A**). Quando o corpo gorduroso de foi estimulado com piruvato 40 nM, as mitocôndrias do corpo gorduroso das larvas de operárias mostraram maior produção de H_2O_2 nos estágios iniciais, diminuindo ao longo do desenvolvimento larval. Em contraste, a produção de H_2O_2 pelas células do corpo gorduroso das larvas da rainha não sofre alterações (**Figura 18B**).

Figura 18. Produção de H_2O_2 em células de corpo gorduroso de rainha e operárias nos estágios sequenciais de desenvolvimento.

Os gráficos representam a produção endógena (A) e sob estímulo de piruvato (B). Os dados são médias e erro padrão da média ($n = 3$). As diferenças estatísticas entre as duas castas foram testadas por two-way ANOVA com correção por teste de Bonferroni (***) $p < 0.001$.

Tendo em vista que larvas de rainha possuem um elevadíssimo metabolismo mitocondrial acompanhada de maior taxa de crescimento, esperavamos encontrar grandes diferenças nos níveis de H_2O_2 e consequente dano mensurado por formação de proteína carbonilada e bem como alteração no estado redox das células. No entanto os resultados da **Figura 18** apontaram para diferenças mínimas nos níveis de ROS durante o desenvolvimento e nos levaram a perguntar sobre quais seriam os fatores que influenciam nestes resultados.

Quando ROS são produzidos excessivamente mediante estímulos endógenos e/ou exógenos, estas podem ocasionar oxidações indiscriminadas no ambiente celular e com isso a homeostase redox celular fica comprometida, sendo essa condição favorável para a ativação do sistema enzimático antioxidante. Mediante tais condições, decidimos investigar a expressão de genes relacionados a proteínas antioxidantes, tais como *amMnSOD*, *amCuZnSOD*, *amCatalase*, *amGtpx* e *amGst-1*.

Ao comparar os níveis de expressão gênica entre as castas notamos que larvas de rainhas possuem níveis de expressão maiores para os genes *amMnSOD* e *amCatalase* durante as fases de quarto instar e de alimentação diferencial F1 e F2 do quinto (**Figura 19A, B**). Em seguida, os níveis de expressão gênica se igualam durante a fase F3 e são maiores em larvas de operária durante a fase de tecelagem de casulo. Tal ocorre após um contínuo decaimento dos níveis transcricionais em rainhas e elevação dos mesmos em operárias. Os níveis do transcrito do gene codificador da superóxido dismutase citoplasmática (*amCuZnSOD*) inicialmente são maiores no corpo gorduroso das rainhas durante o quarto estágio larval, diminuindo nos estágios seguintes quando atingem valores inferiores dos de larvas de operárias (**Figura 19 C**). Os níveis de transcrição do gene *amGtpx* apresentam valores elevados apenas no quarto estágio das larvas da rainha quando comparados a operárias e nos estágios seguintes ambas as castas não apresentam diferenças (**Figura 20 D**) Os níveis do gene *amGst1* mostrados na **Figura 20 E** foram maiores nas larvas de rainhas

Quando os mesmos dados são postados em um mesmo gráfico para cada casta e fase de desenvolvimento é possível observar padrões aparentemente distintos no que diz respeito ao “investimento na barreira de antioxidantes.” Isso significa que, apesar de larvas de rainhas possuírem níveis mais elevados de expressão genica do que larvas operárias, ambas as castas investem principalmente na expressão dos genes codificadores da superóxido dismutase mitocondrial e da catalase em comparação com os outros genes (**Figura 20**). Durante o desenvolvimento de larvas de rainhas esses genes passam por uma pequena queda durante a transição do quarto instar para a fase F1 do quinto, antes de atingir um pico durante a fase de alimentação (4-6 vezes em relação às fases anteriores), e diminuindo ao entrar na fase de tecelagem de casulo. Diferentemente, as larvas de operárias apresentaram níveis de transcrição mais baixos durante as fases iniciais, apenas aumentando durante as últimas etapas de desenvolvimento.

Figura 19. Comparação dos níveis de transcritos de genes relacionados a enzimas antioxidantes entre larvas de rainhas e operárias.

Os níveis de expressão gênica foram obtidos por RT-qPCR para *amMnSod* (A), *amCuZnSod* (B), *amCatalase* (C), *amGtpx* (D) e *amGst1* (E) por RT-qPCR. Em cada ponto são mostradas as médias e o desvio padrão da média de três amostras biológicas analisadas em triplicata cada uma. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (58) utilizando a expressão de *rp49* para normalização e uma das amostras larvais de quarto instar como calibrador para cada gene. A significância estatística foi analisada por two-way ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 20. Expressão relativa de genes antioxidantes analisados durante o desenvolvimento de larvas rainha e operárias em *A. mellifera*.

Os dados da Figura 19 para os genes *amMnSOD*, *amCuZnSOD*, *amCatalase*, *amGtpx* e *amGst-1* estão aqui agrupados para cada casta, rainha (A) e operárias (B) ao longo do desenvolvimento larval. São mostradas médias e erro padrão da média de três amostras biológicas por estágio e casta analisada em triplicata.

A aferição do estresse oxidativo por ROS pode ser feita por medida direta em fluidos biológicos ou tecidos. Entretanto, a detecção direta é dificultada quando essas ROS estão presentes em concentrações extremamente baixas e por terem meia-vida curta. Assim, as aferições indiretas dos danos causados por ROS têm sido a alternativa para mensurar a magnitude do dano oxidativo causado (62). Uma maneira indireta de determinar o nível deste estresse oxidativo é identificar os níveis de carbonilação de proteínas. Ao quantificar a taxa de proteína carbonilada em células de corpo gorduroso de larvas de rainhas observamos níveis elevados quarto instar, diminuindo e permanecendo constante nas fases seguintes (**Figura 21A**). Nas larvas operárias apareceu um pico na fase F1, seguido de, diminuição das taxas de proteína carbonilada durante as fases seguintes. Conclui-se que, apesar das oscilações observadas para cada casta, as duas convergem para valores iguais de proteína carbonilada nas fases que precedem e marcam a entrada na metamorfose.

A quantificação da glutatona (GSH, forma reduzida) e glutatona dissulfeto (GSSG, forma oxidada) tem sido considerada como importante indicador do estado redox e útil para estudos de estresse oxidativo nas células (63). Para melhor compreender os resultados anteriores, quantificamos os níveis de GSH e GSSG no corpo gorduroso das larvas de rainhas e operárias e calculamos o estado redox pela relação GSH/GSSG (**Figura 21B**). Os níveis de GSH e GSSG são mostrados separadamente na **Figura 21C e D**, respectivamente. Os resultados corroboraram os resultados obtidos com larvas de operárias em que se observa um pico de razão GSH / GSSG na fase F1 e diminuição dos durante os últimos três estágios analisados. As rainhas, por sua vez, não apresentaram oscilações significativas, e ambas as castas convergem para valores semelhantes ao entrar na fase de tecelagem do casúlo.

Figura 21. Parâmetros de estresse oxidativo e estado redox em corpo gorduroso durante o desenvolvimento larval de rainhas e operárias.

Os gráficos mostram as médias ($n = 5$) e o erro padrão da média dos níveis de proteína carbonilada (A) e do estado redox das células do corpo gorduroso representado pela razão entre glutathiona oxidada, GSH, e glutathiona reduzida, GSSG (B) para as mesmas amostras biológicas de cada fase de desenvolvimento e casta. Os níveis de GSH (C) e GSSG (D) foram medidos separadamente por método fluorimétrico, normalizados e submetidos ao cálculo da razão GSH/GSSG. A significância estatística foi analisada por two-way ANOVA e teste pós-hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

Com base na hipótese de que a acentuada resposta de hipóxia observada em operárias de abelhas poderia estar relacionada ou mesmo causada por diferenças específicas de casta no número e na funcionalidade das mitocôndrias, bem como do metabolismo oxidativo durante o desenvolvimento larval, investigamos a quantidade e localização das mitocôndrias, a expressão de genes potencialmente relacionados com a sua biogênese, bem como as características do estado funcional das mitocôndrias por meio de ensaios de respirometria de alta resolução, a relação com efeito Warburg e como o sistema antioxidante é modulado de modo a acompanhar as demandas fisiológicas do desenvolvimento diferencial das larvas das duas castas.

Tendo com base os experimentos de microscopia e ensaio de citrato sintase, encontramos evidências claras de que o número de unidades morfológicas e funcionais mitocondriais é mais elevado nas células do corpo gorduroso da rainha em comparação com o da operária e que isso reflete diretamente um elevado estado metabólico mitocondrial, neste caso entendido como maior demanda de ATP, durante as fases críticas para desenvolvimento divergente das castas. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores já publicados há várias décadas que analisaram quantidades de mitocôndrias e o metabolismo respiratório no corpo inteiro de larvas de abelhas (37, 38). A diferença, é que nosso estudo foca no corpo gorduroso como importante plataforma metabolismo intermediário da abelha (64) e que este ocupa a maior parte da cavidade do corpo de larvas de *A. mellifera* (47).

Nas imagens de imunofluorescência (**Figura 6**) e nas análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão (**Figura 7, 8, 9 e 10**) as mitocôndrias aparecem concentradas em duas principais regiões intracelulares, possivelmente compreendendo duas populações funcionais, uma abaixo da membrana plasmática e a outra na área perinuclear. A primeira população mitocondrial é totalmente rodeada pelo sistema reticular da membrana plasmática, uma estrutura descrita no corpo de gorduroso de vários outros insetos que possui a função aumentar a área de translocação de nutrientes para a célula (65, 66). Considera-se que as vesículas endocitóticas observadas em trofócitos do corpo gorduroso de abelha estão envolvidas na absorção de nutrientes a partir da hemolinfa durante o desenvolvimento (47) e que as mitocôndrias associadas ao sistema reticular da membrana plasmática possivelmente fornecem as unidades ATP necessárias para este transporte (**Figura 22A**). A segunda

população mitocondrial esta incorporada dentro de uma rede de retículo endoplasmático perinuclear ou dispersa dentro do citoplasma perinuclear (**Figura 22B**). Esta segunda rede mitocondrial possivelmente está envolvida no fornecimento de energia para uma ampla gama de processos de conversão metabólica, bem como fornecimento de unidades de energia aos processos de resposta fisiológica das células. Assim, a posição dessas populações mitocondriais sugere diferenças entre as duas castas referentes à localização estratégica dessas organelas para fornecimento de energia localmente necessária.

Figura 22. Esquema das duas populações mitocondriais encontradas em trofócitos de corpo gorduroso em larvas de *A. mellifera* durante desenvolvimento larval.

À direita encontramos o esquema generalizado de um trofócito do qual setas apontam para primeira população mitocondrial (A) que se formaria adjacente à membrana plasmática em resposta a alta demanda energética devido à intensa incorporação de nutrientes advindos da digestão do alimento recebido durante a fase de alimentação, tanto em larvas de rainhas quanto operárias. A segunda população (B) é incorporada dentro de uma rede de retículo endoplasmático adjacente ao núcleo e que

estaria alocada estrategicamente neste local para fornecer energia para uma gama de processos fisiológicos e metabólicos.

Uma observação interessante foi o aparecimento de mitocôndrias em forma de cálice encontradas exclusivamente em trofócitos do corpo gorduroso de rainhas (**Figura 11**). Esta forma peculiar é evolutivamente conservada e é associada a mitocôndrias expostas a condições estressantes (67, 68). Experimentalmente, essa morfologia pode ser induzida quando mitocôndrias saudáveis são expostas a drogas desacopladoras que afetam diretamente a função mitocondrial (68), e duas famílias de proteínas, Parkin e mitofusinas são conhecidos como reguladoras da transição conformacional da mitocondria (68). A pergunta é, o que pode ser a condição tão estressante que provoca este fenótipo mitocondrial apenas em larvas de rainhas? Poderia isso estar relacionado à maior capacidade de fosforilação oxidativa mitocondrial e, portanto, a um maior nível de espécies reativas de oxigênio (ROS)? Ou mesmo, esta conformação seria decorrente de compostos presentes na geléia real?

A distribuição intracelular mitocondrial e o número de unidades funcionais mitocondriais nas células do corpo gorduroso (**Figura 12**) aumentaram juntamente com a capacidade de fosforilação oxidativa do tecido (**Figura 13 e 14**) durante o quinto instar, especialmente nas larvas de rainha. Subsequentemente, o número de unidades funcionais e capacidade de fosforilação oxidativa diminuíram à medida que as larvas pararam de alimentar e entraram na fase de tecelagem de casulo. Subsequentemente, no estágio pré-pupal, as células do corpo gorduroso larval sofrem histólise, liberando todo seu conteúdo na hemolinfa (64, 69). Deste modo, a diminuição observada no número mitocondrial e na capacidade de fosforilação nas larvas do estágio de tecelagem de casulo representaria já uma etapa preparatória para o processo de metamorfose das abelhas. Resumimos estes resultados na **Figura 23**.

Figura 23. Representação esquemática das mudanças específicas em cada casta na distribuição e número de células mitocondriais em células de corpo gorduroso de larvas de rainhas e operárias de *Apis mellifera*.

Até o quarto instar a ultraestrutura dos trofócitos ainda é semelhante para os dois tipos de larvas, mas sob a influência de regimes diferenciais de alimentação larval, diferenças na distribuição das mitocôndrias e o número de unidades funcionais mitocondriais tornam-se aparentes. Essas diferenças são especialmente evidentes durante os estágios de alimentação do quinto instar larval, quando as taxas de crescimento de larvas de rainhas excedem em muito às das larvas de operárias. Ao entrar na fase de tecelagem de casulo e preparar-se para a metamorfose, os dois tipos de larvas novamente se parecem mais uns aos outros em termos de distribuição e número mitocondrial, exceto pela presença de mitocôndria em forma de cálice (denotados pelo círculo marrom), que são vistos exclusivamente no corpo gorduroso da rainha. O número mitocondrial foi quantificado ensaio de citrato sintase; a linha azul mostra os dados para o corpo gorduroso de rainhas e a vermelha para as operárias. Fonte: Santos et al. (2016).

Ao analisarmos a funcionalidade das mitocôndrias do corpo gorduroso deparamos com uma taxa de fosforilação oxidativa superior em larvas de rainhas. Para obter uma visão mais profunda das diferenças de castas na funcionalidade mitocondrial, calculamos as razões de controle do fluxo mitocondrial, que expressam o controle respiratório independente do conteúdo mitocondrial e do tamanho da célula. Encontrou-se que aproximadamente 40% da capacidade máxima de consumo de O_2 está relacionada ao estado de vazamento (*Leaking*) em ambas as castas (**Figura 15A e Tabela 3**), ou seja, 40% de todo oxigênio consumido pelo

tecido do corpo gorduroso não está diretamente atrelado a produção de energia por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Esse resultado poderia refletir um desacoplamento intrínseco como compensação para um vazamento de prótons, para ciclagem de cátions (Ca^{2+} , K^+), e/ou como resposta a moléculas de oxigênio utilizadas para produzir espécies reativas de oxigênio (70). Isto significa que, apesar de larvas rainha terem mais mitocôndrias e maior consumo de O_2 , a eficiência mitocondrial das duas castas é essencialmente semelhante. Esta afirmação recebe suporte pelo cálculo da razão *Leak/Phosphorylation* que se refere ao desacoplamento em relação a capacidade fosforilativa do sistema (**Figura 15B**). Além disso, devido ao fato da razão *Phosphorylation/ETS* ser semelhante em ambas castas, isto indica que rainhas e operárias apresentam uma mesma limitação no sistema de fosforilação oxidativa (**Figura 15C**). Por outro lado, a razão *CII-linked/ETS* denota que o consumo de oxigênio dependente da conversão de succinato a fumarato pelo complexo II é maior em operárias (**Figura 15D**). Por fim, embora a produção de ATP mitocondrial seja maior nas rainhas, a demanda de produção de ATP é 20% menor em relação a sua capacidade mitocondrial máxima de transporte de elétrons (ETS), dada pela razão *Routine/ETS* (**Figura 15E**). Em outras palavras, é possível concluir que a demanda fisiológica de oxigênio pelas mitocôndrias da rainha é menor que a das larvas de operárias. Uma das razões pode ser que os substratos disponíveis para a fosforilação oxidativa em larvas de rainhas são mais ricos em energia e que rainhas fazem mais uso de substratos metabólicos além de carboidratos para produção de ATP, ou que a quantidade pura de geleia real que recebem impulsiona a seu metabolismo energético.

A partir destas considerações, a hipótese levantada é de que tais diferenças na quantidade e/ou qualidade dos substratos energéticos advindos da alimentação diferencial possam afetar diretamente o número mitocondrial e a morfologia destas no órgão central do metabolismo intermediário das abelhas. Por exemplo, sabe-se que a privação de alimento em mamíferos promove a fissão mitocondrial, enquanto uma dieta com alto teor de gordura promove a fusão mitocondrial e a biogênese, aumentando a área mitocondrial (71, 72). Assim, a maior concentração de lipídios e açúcar na geleia real (73, 74) poderia estar relacionado tanto com o maior número mitocondrial quanto com os maiores níveis de fosforilação oxidativa observados no corpo gorduroso da rainha através das regulação de fatores de transcrição. Além disso, larvas de rainhas são alimentadas por operárias nutridoras aproximadamente 10 vezes mais frequentes que as larvas de operárias (75). Neste ponto, também é interessante discutir se essas diferenças no número mitocondrial e funcionalidades

relacionadas à diferenciação de castas na fase larval podem causalmente refletir nas diferenças observadas quanto ao metabolismo energético mitocondrial de abelhas adultas. Considerando que o estresse oxidativo diminuiu com a idade nas células de corpo gorduroso de operárias (76), o oposto ocorre nas rainhas, já que as rainhas mais velhas apresentaram níveis mais elevados de ROS e atividades enzimáticas menores relacionadas ao estresse oxidativo, como superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase, em comparação com rainhas jovens (77). No entanto, quando normalizado contra a densidade mitocondrial, o metabolismo de energia mitocondrial, bem como os níveis de transcrição dos genes codificadores da ATP sintase e NADH desidrogenase 1 foram semelhantes em rainhas jovens e velhas (76).

Embora as diferenças no uso de substratos energéticos fornecidos através dos regimes dietéticos diferenciais, tanto no ciclo larval como no ciclo de vida adulto das rainhas e operárias de abelhas possam afetar diretamente o consumo de oxigênio nas mitocôndrias, as diferenças entre as castas no número mitocondrial provavelmente envolvem a expressão de fatores de transcrição que controlam a biogênese mitocondrial. Aqui nós observamos níveis de expressão mais altos para dois dos três genes codificadores de fator de transcrição mitogênicos (*amTFB1* e *amTFB2*, mas não *amTFAM*) no corpo gorduroso larval da rainha (**Figura 16**). Especialmente a expressão de *amTFB2* foi significativamente maior durante o quarto instar e todas as fases pré-metamórficas do quinto instar. O gene *amTFB1* se mostrou mais expresso em larvas de rainha no início do quinto instar. Estes resultados estão em plena concordância com os nossos resultados fisiológicos e morfológicos e levam a inferir que esses fatores de transcrição poderiam ser reguladores genuínos da diferença mitocondrial fenotípica observadas no corpo gorduroso de larvas de rainha e operária em resposta ao programa de alimentação diferencial (**Figura 24**).

O receptor relacionado com estrogênio, ERR, é relatado como sendo um regulador essencial do catabolismo de carboidratos em larvas de *Drosophila*, controlando a expressão de vários genes nas vias de glicólise e pentose fosfato. Este receptor nuclear também regula alguns intermediários do ciclo de ácido tricarboxílico, bem como os níveis de ATP e lactato (78). Este receptor nuclear está também ligado a respostas de controle associadas ou não a HIF α (79). Surpreendentemente, os níveis mais baixos de expressão do gene *amERR* observados em larvas de operárias (**Figura 16D**) aparentemente contradizem o que se sabe sobre as funções de ERR na *Drosophila*. No entanto, como já demonstrado anteriormente (8),

as conectividades nas principais vias de detecção de nutrientes parecem ter sido remodeladas em *A. mellifera* como consequência da evolução de duas castas fenotípicas diferentes com histórias de vida distintas, rainhas altamente férteis e longa expectativa de vida e operárias facultativamente estéreis e de curta duração de vida. Evidentemente, isso representa uma clara ruptura em um dogma central da vida dos metazoos, o balanço (*trade-off*) entre reprodução e manutenção somática (80). Especulamos que a diferença observada nos níveis de expressão do *amERR* entre rainhas e operárias pode ter sua origem em respostas intrínsecas aos diferentes ambientes nutricionais das larvas, não apenas na quantidade de alimentos, mas também na qualidade, como as quantidades relativas de lipídios, carboidratos e proteínas (81). Além disso, estudos recentes revelaram diferenças interessantes na composição de micro-RNA destas dietas larvais (81) e no corpo larval (82), que poderiam tanto modular a expressão do receptor de estrogênio desta espécie. No entanto, o papel real deste gene no processo de diferenciação de casta ainda necessita ser investigado.

Figura 24. Representação esquemática denotando a reposta dos fatores de transcrição controladores do processo de biogênese mitocondrial, TFB1 e TFB2, em detrimento ao regime de alimentação diferencial que larvas de rainha e operárias possuem.

O gráfico ilustra como as diferenças na quantidade e qualidade alimentar que as larvas recebem possam modular a expressão destes fatores de transcrição, afetando a biogênese mitocondrial e consequente aumento no consumo de oxigênio pelas células do corpo gorduroso.

Como não há razões para supor que as larvas de rainha e operária possam ser expostas a diferentes concentrações ambientais de oxigênio uma vez que são criadas em células abertas de cria próximas umas das outras, é interessante especular sobre como a resposta à hipóxia e as diferenças do fenótipo mitocondrial podem realmente estar conectadas. Aparentemente, embora criadas sob os mesmos níveis de oxigênio externo, as células do corpo gorduroso de larvas de operárias aparentemente mantêm taxas mais baixas de consumo de oxigênio com maior demanda fisiológica. Poderia este estado fisiológico ser semelhante ao efeito Warburg visto em células tumorais? Aqui mostramos que os níveis de lactato (**Figura 17**) no corpo gorduroso de rainha e operárias são similares, o que sugere uma condição de homeostase e aponta para outra hipótese que possa explicar as mudanças metabólicas associadas com níveis mais elevados de transcrição de genes relacionados à hipóxia observados durante o desenvolvimento de larvas de operárias. No entanto, vale a pena mencionar que os níveis de lactato diminuíram quatro vezes durante a transição do quarto para o quinto instar em larvas de rainhas. Uma ligeira diminuição também foi observada em larvas de operárias, mas, diferentemente de rainhas, esta não foi mantido níveis constantes nas próximas fases do quinto instar, justamente quando ocorre um aumento inicial na biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa nas células do corpo gorduroso (**Figuras 12 e 13**). Isto poderia indicar uma possível mudança metabólica do estado glicolítico aeróbico para a fosforilação oxidativa, justamente quando começa o principal período em que as larvas de rainhas recebem grande quantidade de geleia real. Interessantemente, os perfis dos níveis de lactato nas duas castas de certa forma se assemelham aos perfis dos níveis de expressão dos genes codificadores para os dois receptores de insulina nas larvas de abelhas (16).

No que diz respeito ao estresse oxidativo, os nossos resultados mostram claramente que, apesar do elevadíssimo número e atividade mitocondrial no corpo gorduroso de larvas de rainhas, a produção de H_2O_2 é relativamente semelhante à de operárias, apresentando poucas diferenças e convergindo a valores semelhantes em algumas fases analisadas (**Figura 18A**). Uma possível explicação para tal convergência pode ser o fato de que larvas de rainhas apresentarem níveis mais elevados dos transcritos dos genes codificadores de proteínas com funções antioxidantes, como da superóxido dismutase intramitocondrial, que converte radicais em peróxido de hidrogênio, e a catalase, que neutraliza este peróxido de hidrogênio em água, associado também à maior expressão do gene codificador da glutathione S-transferase atuando na desintoxicação celular (**Figura 19**). Apesar dessas diferenças nos níveis de expressão desses genes, ambas as castas investem principalmente na expressão gênica de *amMnSOD* e

amCatalase. Tal fato, associado aos menores níveis de expressão do gene codificador da superóxido dismutase citoplasmática (*amCuZnSOD*), é possível inferir que a maior parte do H_2O_2 é produzida dentro das mitocôndrias em ambas as castas.

Possivelmente devido ao menor metabolismo e taxas de crescimento mais baixas encontradas em larvas de operárias, as enzimas antioxidantes começam a atuar em estágios posteriores de desenvolvimento (**Figura 20B**). O corpo gorduroso de larvas operárias não apresenta grandes alterações na fosforilação oxidativa apesar de ocorrer um aumento simples no número mitocondrial durante o desenvolvimento das larvas, o que poderia explicar o atraso na iniciação da transcrição de genes do sistema antioxidante como catalase e superóxido dismutase intramitocondrial, que começam a partir do estágio F2 do quinto instar. Apesar disso, uma pequena alteração de sinalização via ROS e no ambiente redox, dada pelos valores de proteína carbonilada e relação GSH/GSSG respectivamente (**Figura 21**) foi encontrada no início da fase de alimentação do quinto instar larval. Curiosamente é no mesmo estágio que ocorre o principal pico nos níveis de transcrição de *Amsima* (22). Alterações no ambiente redox e aumento da produção de ROS estão associadas à inibição de prolyl hidroxilases e estabilização com HIF1 α (AmSima) em células de mamíferos (30). Embora os níveis de H_2O_2 em operárias não sejam superiores às de rainhas (**Figura 18**), é possível especular que estes níveis poderiam ser suficientes para gerar a sinalização de ROS. Segundo Schieber e Chancel (16) alterações na produção de H_2O_2 necessárias para a sinalização celular não causam mudanças significativas na razão intracelular de glutathione oxidada/reduzida. Pelo contrário, grandes alterações nestes parâmetros são geralmente um sinal de estresse oxidativo causando toxicidade ao invés de sinalização redox. No entanto, a razão GSG/GSSH mais altas em larvas de operárias e a sua associação aos níveis mais altos de expressão dos genes relacionada à hipóxia (22) ainda não estão esclarecidas e necessitam de investigação.

A alta concentração de açúcar e lipídios na geléia real (81) e a grande quantidade de alimento que as larvas de rainhas recebem inevitavelmente direcionam a altas taxas de crescimento dentro de um curto período de desenvolvimento (5, 83, 84), e a base para tal crescimento pode ser encontrada na alta taxa de fosforilação oxidativa mitocondrial para gerar ATP. Assim de modo a evitar possíveis danos causados pelas elevadas taxas de fosforilação, o corpo gorduroso da rainha aparentemente modula de modo diferente a expressão dos genes antioxidantes quando comparada à operária, acompanhando o processo da elevada biogênese mitocondrial. Deste modo, os níveis menores da expressão dos genes codificadores da

catalase e superóxido dismutase citoplasmática e mitocôndria são suficientes para manter os níveis de H_2O_2 semelhantes aos níveis de operárias durante o quarto instar larval (**Figura 18A, 20A**). Durante a transição para o estágio de alimentação ocorre o aumento no número mitocondrial e fosforilação oxidativa, juntamente com uma ligeira diminuição nos níveis de transcritos para *amMnSOD* e *amCatalase*, resultando no primeiro pico de produção de H_2O_2 . Na próxima fase (F2), o aumento surpreendente de *amMnSOD* e *amCatalase* supera o aumento da fosforilação oxidativa e leva os níveis de H_2O_2 novamente a padrões semelhantes de operárias. Durante a fase seguinte (F3) a fosforilação oxidativa permanece elevada, mas os níveis de transcritos antioxidantes diminuem, resultando no segundo pico de produção de H_2O_2 . Na entrada da fase de tecelagem do casulo, os níveis de H_2O_2 diminuem junto com e consequente a diminuição da fosforilação oxidativa. Curiosamente, apesar da oscilação observada nos níveis de H_2O_2 analisados, não notou-se alterações no ambiente redox e houve nenhum indício de estresse oxidativo no corpo gorduroso das larvas de rainhas (**Figura 21**). Poderia essa homeostase ser atribuída unicamente a fatores intrínsecos do organismo larval da rainha ou pode tal ser atribuído em parte a substâncias antioxidantes presentes na geleia real? Trabalhos de análises de componentes presentes na geleia real indicam um poder redutor, atividade contra a peroxidação lipídica e diminuição da formação de radicais superóxidos (85, 86). Entretanto, por enquanto não há identificação de componentes associados a estas propriedades, bem como se estes componentes poderiam também estar presentes na geleia larval dada à operária.

6 CONCLUSÃO

Os dados deste trabalho permite-nos concluir que:

- a. Larvas de rainha possuem maior número de unidades morfológicas e unidade funcionais de mitocôndrias nas células pertencentes ao corpo gorduroso devido principalmente à intensa biogênese mitocondrial durante a fase de alimentação diferencial;
- b. Durante o desenvolvimento larval as mitocôndrias dos trofócitos se alojam em regiões aparentemente de acordo com a demanda energética local;
- c. Apesar das diferenças no consumo de oxigênio as mitocôndrias de rainhas e operárias apresentam basicamente a mesma eficiência mitocondrial. Assim o maior consumo de oxigênio encontrado nas larvas de rainhas seria basicamente devido a maior biogênese mitocondrial durante a fase de alimentação, que decai posteriormente nas fase de tecelagem de casulo;
- d. Os fatores de transcrição amTFB1 e amTFB2 são fortes candidatos a regular o processo de biogênese mitocondrial em células de corpo gorduroso;
- e. O órgão do corpo gorduroso larval de operárias não sofre efeito Warburg;
- f. O elevado nível de expressão de genes antioxidantes em larvas de rainhas acompanha a biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa do corpo gorduroso garantindo não só o equilíbrio do estado redox e estresse oxidativo das células bem como níveis semelhantes de produção de peróxido de hidrogênio em comparação a operárias.

Por fim, a partir de uma visão mais ampla entre as diferentes abordagens experimentais deste trabalho, nossos resultados são um passo na direção de uma visão integradora sobre a nutri-genômica do metabolismo larval de *Apis mellifera*. Estes resultados são fortes evidências de que a nutrição diferencial de larvas de rainhas e operárias pelas abelhas nutridoras afeta não apenas a dinâmica e funcionalidade mitocondrial, como também a modulação de enzimas antioxidantes que garantem a homeostase do desenvolvimento larval. As conclusões foram resumidas na **Figura 25**.

Figura 25: As características mitocondriais e parâmetros do metabolismo oxidativo do corpo gorduroso no desenvolvimento das castas em *Apis mellifera*.

(A) Larvas de *Apis mellifera* recebem alimentação diferencial durante as fases de desenvolvimento pós-embrionário que culminará no desenvolvimento de rainhas ou operárias. Após passagem pelo trato intestinal os compostos nutrientes são processados e armazenados em trofócitos do corpo gorduroso, o centro metabólico de insetos. (B) Nos trofócitos as mitocôndrias se encontram principalmente ao redor do núcleo e abaixo da membrana plasmática, onde supostamente contribuam com a demanda energética específica local. (C) A alimentação diferencial dada a larvas de rainhas leva a um aumento do número de unidades mitocondriais funcionais e maior consumo de oxigênio nessa casta quando comparada a operárias, principalmente durante a fase de alimentação. (D) Dado que resultados da respirometria de alta resolução indicaram que as mitocôndrias

de ambas as castas apresentam basicamente a mesma eficiência, o aumento no consumo de oxigênio e consequente aumento na respiração celular explicar-se-á basicamente devido ao aumento da biogênese mitocondrial induzida (E) pelos maiores níveis de expressão de fatores de transcrição como TFB1 e TFB2 em rainhas (setas azuis) comparadas a operárias (setas vermelhas). (F) Observou-se também maiores níveis transcricionais de enzimas do sistema antioxidante em rainhas, como superóxido dismutase intramitocondrial e catalase (rainhas, seta azul; operária seta vermelha) acompanhando os elevados níveis de respiração mitocondrial e garantindo o equilíbrio do estado redox e do estresse oxidativo nas células do corpo gorduroso em ambas as castas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fonseca VLI, Canhos DAL, Alves DdA, Saraiva AM. Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP; 2012. 488 p.
2. Page RE, Peng CYS. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. Exp Gerontol. 2001;36(4-6):695-711.
3. Michener CD. The social Behavior of the Bee: A Comparative Study. Cambridge: Havard Univiversity Press; 1974. 404 p.
4. Rembold H. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. Insect Biochem. 1987;17(7):1003-6.
5. Nunes-Silva P, Gonçalves LS, Francoy MT, Jong DD. Rate of growth and development time of Africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. Brazilian Journal of Morphological Sciences. 2006;23:325-32.
6. Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. Caste and metamorphosis - Hemolymph titers of juvenile-hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. Gen Comp Endocr. 1990;79(1):31-8.
7. Hartfelder K, Engels W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. Curr Topics Dev Biol 1998;40:45-77.
8. Hartfelder K, Guidugli-Lazzarini KR, Cervoni MS, Santos DE, Humann FC. Old Threads make new tapestry—rewiring of signalling pathways underlies caste phenotypic plasticity in the honey bee, *Apis mellifera* L. Adv Insect Physiology: Academic Press; 2015. p. 1-36.
9. Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simoes ZLP, Maleszka R. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. BMC Dev Biol. 2007;7:70.
10. Cameron RC, Duncan EJ, Dearden PK. Biased gene expression in early honeybee larval development. BMC Genomics. 2013;14:903.
11. Capella ICS, Hartfelder K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. J Insect Physiol. 1998;44(5-6):385-91.
12. Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Worley KC, Evans JD, Maleszka R, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. Nature. 2006;443(7114):931-49.
13. Robinson GE, Grozinger CM, Whitfield CW. Sociogenomics: Social life in molecular terms. Nat Rev Genet. 2005;6(4):257-70.

14. Wheeler DE, Buck N, Evans JD. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*. 2006;15(5):597-602.
15. Oldham S. Obesity and nutrient sensing TOR pathway in flies and vertebrates: functional conservation of genetic mechanisms. *Trends Endocrin Met*. 2011;22(2):45-52.
16. de Azevedo SV, Hartfelder K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development - differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *J Insect Physiol*. 2008;54(6):1064-71.
17. Patel A, Fondrk MK, Kaftanoglu O, Emore C, Hunt G, Frederick K, et al. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One*. 2007;2(6):e509.
18. Dekanty A, Lavista-Llanos S, Irisarri M, Oldham S, Wappner P. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF-alpha/Sima. *J Cell Sci*. 2005;118(23):5431-41.
19. Zepeda AB, Pessoa A, Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VM, Farias JG. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(6):451-9.
20. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30(4):393-402.
21. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001;294(5545):1337-40.
22. Azevedo SV, Caranton OAM, de Oliveira TL, Hartfelder K. Differential expression of hypoxia pathway genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *J Insect Physiol*. 2011;57(1):38-45.
23. Warburg O. Origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
24. Dong XW, Zhang Z, Zhao JD, Lei J, Chen YY, Li X, et al. The rational design of specific SOD1 inhibitors via copper coordination and their application in ROS signaling research. *Chem Sci*. 2016;7(9):6251-62.
25. Wang WH, He EM, Guo Y, Tong QX, Zheng HL. Chloroplast calcium and ROS signaling networks potentially facilitate the primed state for stomatal closure under multiple stresses. *Environ Exp Bot*. 2016;122:85-93.
26. Andersson-Sjoland A, Karlsson JC, Rydell-Tormanen K. ROS-induced endothelial stress contributes to pulmonary fibrosis through pericytes and Wnt signaling. *Lab Invest*. 2016;96(2):206-17.
27. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha during hypoxia - a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25130-8.

28. Hagen T. Oxygen versus reactive oxygen in the regulation of HIF-1 α : the balance tips. *Biochem Res Int.* 2012;2012:436981
29. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-R62.
30. Li YN, Xi MM, Guo Y, Hai CX, Yang WL, Qin XJ. NADPH oxidase-mitochondria axis-derived ROS mediate arsenite-induced HIF-1 α stabilization by inhibiting prolyl hydroxylases activity. *Toxicol Lett.* 2014;224(2):165-74.
31. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol.* 2010;45(7-8):466-72.
32. Lambeth JD. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-9.
33. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human-disease. *Ann Intern Med.* 1987;107(4):526-45.
34. Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao YP, Ho YS, Reddi AR, et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev.* 2016;96(1):307-64.
35. Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD, Reddy CC. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 2004;424(1):72-80.
36. Rhee SG. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 2006;312(5782):1882-3.
37. Melampy RM, Willis ER. Respiratory metabolism during larval and pupal development of the female honeybee (*Apis mellifica L.*). *Physiol Zool.* 1939;12:302–11.
38. Osanai M, Rembold H. Development-dependent mitochondrial enzyme activities in castes of honey bee. *Biochim Biophys Acta.* 1968;162(1):22-31.
39. Eder J, Kremer JP, Rembold H. Correlation of cytochrome-C titer and respiration in *Apis mellifera* - adaptive response to caste determination defines workers, intercastes and queens. *Comp Biochem Phys B.* 1983;76(4):703-16.
40. Corona M, Estrada E, Zurita M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J Exp Biol.* 1999;202(8):929-38.
41. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol.* 2014;56:182-8.
42. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014;505(7483):335-43.
43. Mukherjee S, Duttaroy A. Spargel/dPGC-1 is a new downstream effector in the insulin–TOR signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics.* 2013;195:433–41.

44. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1354-66.
45. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. 2008;88(2):611-38.
46. Dominy JE, Puigserver P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *CSH Perspect Biol*. 2013;5(7):1-16.
47. Cruz-Landim C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora Unesp; 2009. 407 p.
48. Liu Y, Liu HH, Liu SM, Wang S, Jiang RJ, Li S. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch Insect Biochem*. 2009;71(1):16-30.
49. Becker A, Schloder P, Steele JE, Wegener G. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*. 1996;52(5):433-9.
50. Van der Horst DJ. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comp Biochem Phys B*. 2003;136(2):217-26.
51. Michelette ERD, Soares AEE. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. 1993;24(4):431-40.
52. Williams RS, Salmons S, Newsholme EA, Kaufman RE, Mellor J. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1986;261(1):376-80.
53. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
54. Rossato FA, Zecchin KG, La Guardia PG, Ortega RM, Alberici LC, Costa RAP, et al. Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic Melan-A cells associated with inhibition of mitochondrial respiration. *PLoS One*. 2014;9(6):e101060.
55. Gnaiger E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle New perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell B*. 2009;41(10):1837-45.
56. Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(11):1230-8.
57. Lourenco AP, Mackert A, Cristino AD, Simoes ZLP. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*. 2008;39(3):372-85.
58. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
59. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins - spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-63.

60. Hissin PJ, Hilf R. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74(1):214-26.
61. Dedej S, Hartfelder K, Aumeier P, Rosenkranz P, Engels W. Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J Apicult Res.* 1998;37(3):183-90.
62. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brit J Pharmacol.* 2004;142(2):231-55.
63. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Bio Med.* 2001;30(11):1191-212.
64. Kok SH, Hou KL, Hong CY, Chao LH, Lai EHH, Wang HW, et al. Sirtuin 6 Modulates hypoxia-induced apoptosis in osteoblasts via inhibition of glycolysis: implication for pathogenesis of periapical lesions. *J Endodont.* 2015;41(10):1631-7.
65. Locke M. The development of the plasma-membrane reticular system in the fat-body of an insect. *Tissue Cell.* 1986;18(6):853-67.
66. Roma GC, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron.* 2010;41(5):395-401.
67. Ponomareva AA, Polygalova OO. Changes in mitochondrial shape in wheat root cells exposed to mitochondrial poisons. *Russ J Plant Physiol.* 2012;59(3):428-33.
68. Ding WX, Li M, Biazik JM, Morgan DG, Guo FL, Ni HM, et al. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *J Biol Chem.* 2012;287(50):42373-8.
69. Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol.* 2010;55:207-25.
70. Mi YS, Xiao CX, Du QW, Wu WQ, Qi GY, Liu XB. Momordin Ic couples apoptosis with autophagy in human hepatoblastoma cancer cells by reactive oxygen species (ROS)-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Free Radical Bio Med.* 2016;90:230-42.
71. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell.* 2010;38(6):864-78.
72. Dietrich MO, Liu ZW, Horvath TL. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell.* 2013;155(1):188-99.
73. Asencot M, Lensky Y. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochem.* 1988;18:127-33.

74. Wang Y, Ma LT, Zhang WX, Cui XP, Wang HF, Xu BH. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2016;47(1):48-56.
75. Lindauer M. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vergl. Physiol*. 1952; 34: 299-345.
76. Hsu CY, Hsieh YS. Oxidative stress decreases in the trophocytes and fat cells of worker honeybees during aging. *Biogerontology*. 2014;15(2):129-37.
77. Hsieh Y-S, Hsu C-Y. Oxidative stress and anti-oxidant enzyme activities in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuv Res*. 2013;16(4):295-303.
78. Tennessen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metab*. 2011;13(2):139-48.
79. Li Y, Padmanabha D, Gentile LB, Dumur CI, Beckstead RB, Baker KD. HIF- and non-hif-regulated hypoxic responses require the estrogen-related receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. 2013;9(1): e1003230.
80. Flatt T, Amdam GV, Kirkwood TBL, Omholt SW. Life-history evolution and the polyphenic regulation of somatic maintenance and survival. *Q Rev Biol*. 2013;88(3):185-218.
81. Guo XQ, Su SK, Skogerboe G, Dai SAJ, Li WF, Li ZG, et al. Recipe for a busy bee: micrnas in honey bee caste determination. *PLoS One*. 2013;8(12): e81661.
82. Ashby R, Foret S, Searle I, Maleszka R. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Sci Rep* 2016;6: 18794.
83. Thrasyvoulou AT, Benton AW. Rates of growth of honeybee larvae. *J Apicult Res*. 1982;21(4):189-92.
84. Santos DE, Alberici LC, Hartfelder K. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *Insect Biochem Molec*. 2016;73:1-11.
85. Liu JR, Yang YC, Shi LS, Peng CC. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *J Agr Food Chem*. 2008;56(23):11447-52.
86. Guo H, Ekusa A, Iwai K, Yonekura M, Takahata Y, Morimatsu F. Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2008;54(3):191-5.

ANEXO A

Avaliação dos resultados dos *primers* relacionados à biogênese mitocondrial

Na figura A apresenta uma fotografia do gel de poliacrilamida denotando teste de amplificação dos primers ERR, TFB1, TFB2 por PCR diferentes graus de temperatura de amplificação. Em B é mostrado o resultado da amplificação do produto de PCR utilizado para sequenciamento.

Old Threads Make New Tapestry—Rewiring of Signalling Pathways Underlies Caste Phenotypic Plasticity in the Honey Bee, *Apis mellifera* L.

Klaus Hartfelder^{*,1}, Karina R. Guidugli-Lazzarini^{*}, Mario S. Cervoni^{*}, Douglas E. Santos^{*,†}, Fernanda C. Humann^{*,†}

^{*}Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

[†]Instituto Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus do Matão, Matão, São Paulo, Brazil

¹Corresponding author: e-mail address: klaus@finrp.usp.br

Contents

1. Introduction	2
2. Differential Feeding of Honey Bee Larvae	3
3. The Secrets of Royal Jelly	5
4. The Role of JH in Honey Bee Caste Development	7
5. IIS, TOR and Egfr Pathway Activities in Honey Bee Caste Development	13
6. Endogenous Hypoxia in Worker Larvae—Convergence of Nutrient Signalling and Oxidative Metabolism	20
7. Epigenetics and Caste Development	22
8. Are There Commonalities Between Context-Dependent Signalling Pathways in Larval Caste Development and Adult Caste Function?	24
9. Conclusions	26
Acknowledgements	29
References	29

Abstract

Caste development in social Hymenoptera represents a prime example of phenotypic plasticity and variation in life histories and is best understood in honey bees. We review the larval feeding regimes and major signalling pathways involved in the divergent developmental trajectories. The role of juvenile hormone (JH) is discussed with an emphasis on the regulation of JH synthesis, degradation and the molecular mode of JH action. As there are apparent inconsistencies between the expression of insulin, TOR and Egfr pathway genes and larval growth rates, we propose that the circuitries and integration of these nutrient-sensing pathways have been remodelled in social evolution. A potential

(Süren-Castillo et al., 2012). This actually fits with the findings in honey bee larvae, where *Amfexo* expression shows a peak exactly when JH titres drop to basal at the end of the fifth instar feeding stage, and with the interpretation that honey bee worker larvae are to a certain extent reared under a sub-optimal dietary regime.

6. ENDOGENOUS HYPOXIA IN WORKER LARVAE— CONVERGENCE OF NUTRIENT SIGNALLING AND OXIDATIVE METABOLISM

The rather unexpected down-regulation of insulin receptor expression in queen larvae made us search for a possibly overarching explanation, i.e., a signalling pathway other than TOR, Egfr or JH that could connect IIS activity with growth and developmental regulation. This led us to look at the hypoxia response pathway in honey bee larvae. The reason was that in *Drosophila* larvae the hypoxia response is closely linked to IIS (Dekanty et al., 2005; Romero et al., 2007). The core module of the hypoxia response comprises three proteins, two are members of the bHLH-PAS family: Sima, which is the homolog of vertebrate HIF α , and Tango, the vertebrate homolog of HIF β . The third is Fatiga, a homolog of the vertebrate HIF prolyl hydroxylase PHD. PHD is a *bona fide* oxygen sensor which hydroxylates specific prolyl residues in the oxygen-sensitive domain of HIF α (Bruick and McKnight, 2001). This causes the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of HIF α (Ivan et al., 2001). PHD is active under normoxic conditions but inhibited under hypoxia, thus causing HIF α to be stabilised, enter the nucleus, and form a dimeric transcription factor with HIF β , which then drives the expression of hypoxia responsive genes (Wang et al., 1995). In *Drosophila* larvae, this response can be seen as a branching response in tracheolar trees (Centanin et al., 2010).

As oxygen consumption is dependent both on exogenous oxygen levels as well as on metabolic state, the activity of PHD is also connected to nutrient-sensing systems. In this context, the nucleolar localisation of Sima is promoted by AKT and TOR function (Dekanty et al., 2005), whereas the TSC proteins down-regulate the hypoxia response (Fig. 4). This link between the nutrient- and oxygen-sensing pathways, which is well established in the fruit fly, made us investigate the hypoxia response in honey bee caste development. To do so, we annotated the three hypoxia response core genes in the honey bee genome and quantified their transcript levels in queen and worker larvae (Azevedo et al., 2011). For all three genes, we observed a gradual increase in expression from the third to the early fifth

Figure 4 The hypoxia response and its connection with insulin and TOR signalling. The graph is based on a model described for *Drosophila melanogaster* (Dekanty et al., 2005). The hypoxia response in honey bee larvae, put in evidence as an over-expression of the three hypoxia core genes *Amfatiga*, *Amsima* and *Amtango* (Azevedo et al., 2011), is interpreted as the result of an endogenous hypoxia. The latter is thought to be related to differences in oxidative metabolism in queen and worker larvae. Activated TOR is thought to stabilise the honey bee HIF α homolog and to facilitate its translocation into the nucleus, where it can dimerise with HIF β and form an active transcription factor driving the expression of hypoxia response genes.

larval instar, i.e., throughout the larval feeding period, and their temporal expression profiles indicated that the three genes are co-regulated. Even more strikingly, all three genes were significantly over-expressed in worker larvae throughout the fifth instar (Azevedo et al., 2011).

The reason for this hypoxia response in workers is not obvious, as there was no reason to assume a difference for oxygen levels in the rearing environment of queen and worker larvae. Both are reared next to each other in unsealed brood cells. Consequently, the assumption is that worker larvae could be in a state of endogenous hypoxia, and this assumption receives strong support from classical physiology and biochemistry analyses done in the 1930s–1980s, i.e., prior to the availability of synthetic JH, which essentially lead to a paradigm change in insect caste development and

research focus (Nijhout and Wheeler, 1982). Classical studies on oxygen consumption in honey bee larvae (Melampy and Willis, 1939) and on mitochondrial enzyme activity (Eder et al., 1983; Osanai and Rembold, 1969) had already put in evidence that queen larvae have higher oxygen consumption rates, higher respiratory rates and a higher cytochrome *c* content. These results also indicated that worker larvae have a mitochondrial deficit (Osanai and Rembold, 1968). To investigate whether the hypothesised mitochondrial deficit may be due to lower mitochondria number or dysfunctional mitochondria, we prepared larval fat body samples for ultrastructure analysis. As seen in Fig. 5, mitochondrial numbers in trophocytes, which are the primary cell type for the insect intermediary metabolism, are strikingly different for queen and worker larvae.

There are three obvious questions arising from these findings, which are actually not all that new. The first question is when do caste differences in mitochondria numbers first become established during larval development? Answering this question will require serial analyses of fat body ultrastructure and/or mitochondria counts via specific labelling of mitochondria in laser confocal microscopy. The second question concerns mechanisms underlying the divergence in mitochondria numbers. These could either be due to differences in mitochondrial biogenesis on the one hand or be due to mitochondrial fusion or autophagy on the other. The overarching, third question, however is, how may the mechanisms driving mitochondrial biogenesis or degradation be coupled to nutrient-sensing signalling pathways? A recent study has shown that a genetic activation of Sima function in *Drosophila* larval fat body can promote autophagy through impairment of the proteasomal system (Löw et al., 2013). Another connection could be through TOR signalling which, in mammalian systems, has been shown to regulate many aspects of mitochondrial function, including mitochondrial biogenesis and mitochondrial degradation (Wei et al., 2014). In a much wider sense, this eventually leads to the question as to whether and how nutrition may act as an epigenetic modifier and become integrated with signalling pathways and transcriptional regulatory networks.

7. EPIGENETICS AND CASTE DEVELOPMENT

The question of epigenetics became a key point for understanding honey bee caste development with the annotation of the honey bee genome (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) where, for the first time, a full DNA methylation toolkit was described in an insect, with components and characteristics similar to that found in mammals. The

Figure 5 Ultra-structure of fat body trophocytes of fourth instar queen (A) and worker larvae (B). Queen trophocytes are rich in mitochondria (M), especially so in the perinuclear (N) space. Lipid vacuoles (V) are found in trophocytes of both castes. Space bars represent 1 μ m.

breakthrough, however, came through an RNA interference experiment designed to functionally silence a honey bee DNA methyltransferase 3 (*Amdnmt3*) gene (Kucharski et al., 2008). Larva fed with *dsdnmt3* RNA showed a strong bias to develop into queen-like females, whereas controls developed as workers. The caste character that was most prominently affected was ovary size, leading to infer that down-regulation of *de novo* DNA methylation apparently led to a widespread epigenetic modification across caste-related genes. Subsequent analyses of differential DNA methylation in adult queens and workers (Lyko et al., 2010) and, especially so, in queen and worker larvae (Foret et al., 2011) then revealed enrichment in differentially methylated genes for three central metabolic pathways:

Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development

Douglas Elias Santos^a, Luciane Carla Alberici^b, Klaus Hartfelder^{a,*}

^a Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2016

Received in revised form

30 March 2016

Accepted 1 April 2016

Available online 4 April 2016

Keywords:

Honeybee

Queen development

Hypoxia response

High-resolution respirometry

Mitochondrial transcription factors

ABSTRACT

The relationship between nutrition and phenotype is an especially challenging question in cases of facultative polyphenism, like the castes of social insects. In the honey bee, *Apis mellifera*, unexpected modifications in conserved signaling pathways revealed the hypoxia response as a possible mechanism underlying the regulation of body size and organ growth. Hence, the current study was designed to investigate possible causes of why the three hypoxia core genes are overexpressed in worker larvae. Parting from the hypothesis that this has an endogenous cause and is not due to differences in external oxygen levels we investigated mitochondrial numbers and distribution, as well as mitochondrial oxygen consumption rates in fat body cells of queen and worker larvae during the caste fate-critical larval stages. By immunofluorescence and electron microscopy we found higher densities of mitochondria in queen larval fat body, a finding further confirmed by a citrate synthase assay quantifying mitochondrial functional units. Oxygen consumption measurements by high-resolution respirometry revealed that queen larvae have higher maximum capacities of ATP production at lower physiological demand. Finally, the expression analysis of mitogenesis-related factors showed that the honey bee TFB1 and TFB2 homologs, and a nutritional regulator, ERR, are overexpressed in queen larvae. These results are strong evidence that the differential nutrition of queen and worker larvae by nurse bees affects mitochondrial dynamics and functionality in the fat body of these larvae, hence explaining their differential hypoxia response.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The castes of social insects, and especially so the queens and workers of the honey bee, *Apis mellifera*, are textbook examples of a facultative polyphenism, meaning that the adult caste phenotype is contingent on and influenced by environmental factors that act during development. In the honey bee, this environmental factor is the differential feeding of larvae by nurse bees. Larvae that received copious amounts of royal jelly, a secretion of the nurses' hypopharyngeal and mandibular glands, during their entire growth period of approximately five days will develop into queens, while larvae that received a less carbohydrate-rich worker jelly during the first three days and then a mixed diet of glandular secretion,

pollen and honey during the next two days of their growth period will develop into workers (Hartfelder et al., 2015; Wang et al., 2016). The outcome of this differential feeding program is that adult workers are facultatively sterile and have small ovaries, smaller body size, and a short adult life span during which they exert, several functions of colony maintenance. In contrast, queens are highly reproductive owing to their large ovaries, have a larger body size, and during their long adult life span their only function is to reproduce (Hartfelder and Engels, 1998; Michener, 1974).

The puzzling question is, how can apparently simple differences in nutrition result in such drastic morphological and life history differences, or, in terms of current concepts of developmental biology, how can nutritional variation be translated into differential gene expression patterns (Barchuk et al., 2007; Cameron et al., 2013) shaping the adult caste phenotypes. The first endogenous factor identified as a queen determining signal was a high juvenile hormone titer in queen larvae (Hartfelder and Engels, 1998; Rachinsky et al., 1990; Rembold, 1987). One of the major effects of

* Corresponding author.

E-mail addresses: douglaselias@usp.br (D.E. Santos), alberici@fcrp.usp.br (L.C. Alberici), klaus@fmrp.usp.br (K. Hartfelder).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.04.001>

0965-1748/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

this hormonal signal is to prevent programmed cell death in the larval queen ovary (Schmidt Capella and Hartfelder, 1998), thus representing the developmental basis for the high reproductive potential of queens. But since the juvenile hormone signaling pathway had not been worked out until recently (Jindra et al., 2013), little progress has been made as to how juvenile hormone actually drives differential gene expression.

Progress on other signaling pathways known to affect growth and differentiation in metazoans had to await the sequencing of the honey bee genome (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). The first candidate pathways studied were the insulin-like signaling (IIS) and TOR pathways (Wheeler et al., 2006). Contrary to expectation, however, the insulin-like peptide encoding genes are not more highly expressed in queen larvae and, especially so, the transcript levels of the two insulin receptors showed a marked decrease just as queen larvae came to surpass worker larvae in their growth rates (Azevedo and Hartfelder, 2008). Another apparent inconsistency was seen for the TOR pathway, where knockdown of gene function by RNA interference indicated an important role of TOR in the formation of queens (Patel et al., 2007), but *Amtor* expression analysis in larval development subsequently showed that this key gene is overexpressed worker and not on queen larvae (Hartfelder et al., 2015).

A possible explanation for these results contradicting expectations on the role of the IIS/TOR pathway in honey bee caste development arose from investigation of the hypoxia signaling pathway, which is known to be functionally integrated with IIS/TOR in *Drosophila* (Dekanty et al., 2005). Expression analysis of the three core genes of the hypoxia pathway, *Amsima*, *Amtango* and *Amfatiga*, showed that they are all more expressed in worker larvae throughout the critical stages of caste development, suggesting a hypoxia response as an important process that defines caste fate in *Apis mellifera* (Azevedo et al., 2011). Since worker and queen larvae are, however, not reared under different conditions of external oxygen availability, the explanation was that worker larvae could be in a state of endogenous hypoxia, a hypothesis that actually matched with previous results on mechanisms underlying honey bee caste development, but which were not further investigated once the powerful role of juvenile hormone in caste development had been demonstrated (Rembold et al., 1974; Wirtz and Beetsma, 1972).

These earlier studies had shown that queen larvae have higher rates of O₂ consumption than workers, indicating differences in the metabolic utilization of nutrients in the differentially fed larvae (Melampy and Willis, 1939). Furthermore, the quantification of mitochondrial proteins, demonstrated that queens have higher amounts of mitochondria (Osanaï and Rembold, 1968). Using cytochrome c as an indicator of respiratory capacity, Eder et al. (1983) then calculated that queen larvae should have respiratory rates six times higher than worker larvae. Subsequently, a study investigating the expression of mitochondrial genes (Corona et al., 1999) confirmed these earlier physiological and biochemical findings, which are all consistent with the endogenous hypoxia hypothesis proposed based on hypoxia gene expression (Azevedo et al., 2011). Hence, together, these data clearly suggest that mitochondrial metabolism should play a crucial role in the caste differentiation process of *A. mellifera*.

The hypoxia response to anoxic environmental conditions is well studied in *Drosophila* embryos and larvae (Callier et al., 2015; Centanin et al., 2010; Dekanty et al., 2005), and it is also well established that the control of cellular metabolism through nutrient-sensing pathways is directly impacted by and related to mitochondrial physiology, including mitochondrial biogenesis and changes in form and function (Baltzer et al., 2010; Friedman and Nunnari, 2014; Palikaras and Tavernarakis, 2014). One of master

regulators of mitochondrial changes in insects is Spargel, the ortholog of co-activator PGC-1 α in mammals. PGC-1 α /Spargel is involved in energy homeostasis, control of mitochondrial proliferation, and is capable of responding to nutrient signaling via mTOR and AMPK (Mukherjee and Duttaroy, 2013; Palikaras and Tavernarakis, 2014). PGC-1 α /Spargel controls the mitochondrial transcription factors A (TFAM), B1 (TFB1) and B2 (TFB2) associated with mitochondrial DNA transcription and, acting together with the Estrogen-related receptor (ERR), regulates the transcription of nuclear genes encoding mitochondrial proteins (Dominy and Puigserver, 2013; Gleyzer et al., 2005; Scarpulla, 2008).

With this in mind, our aim was (i) to investigate the mitochondrial dynamics, i.e. their density and distribution within cells of the larval fat body of queens and workers, (ii) to assess mitochondrial functionality characteristics through high-resolution respirometry measurements of mitochondrial oxygen consumption, and (iii) to analyze the expression mitochondrial transcription factors. We focused in this study on larval fat body, as this tissue is the center of metabolism and nutrient conversion, and because it is composed of only two cell types, trophocytes and oenocytes (Cruz-Landim, 2009). We could show that trophocytes have extensive mitochondrial networks in both castes and that mitochondria are localized in specific cellular regions that are likely related to different intracellular energetics functions. Furthermore, queen larvae had a significantly higher number of mitochondrial functional units at the peak of their growth phase in the fifth instar. The respirometry analyses revealed higher levels of mitochondrial O₂ consumption for queen larvae, but similar mitochondrial efficiency for both castes. And finally, transcript quantification of mitogenesis-related factors showed that two genes (*amTFB1* and *amTFB2*), as well as a putative nutritional regulator (*amERR*) are more expressed in queen larval fat body.

2. Material and methods

2.1. Honey bee larvae

The fat body was dissected from fourth and fifth-instar larvae staged according to Michelette and Soares (1993) and Rachinsky et al. (1990). Here they comprised fourth-instar larvae (L4) and the first six substages of the fifth larval (L5) instar, these being three growth phase stages where larvae are still being fed (F1, F2, F3) and three cocoon-spinning stages (S1, S2, S3) during which the larvae gradually void their gut before they become prepupae. These stages were chosen because it is during these that the hypoxia core genes are differentially expressed between queens and workers (Azevedo et al., 2011). Queen larvae were reared by a standard apicultural procedure from newly hatched larvae transferred into a partially queenless hive, while worker larvae were sampled directly from hives of Africanized hybrid honey bees (*A. mellifera*) kept in the experimental apiary of the Department of Genetics, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

2.2. Immunofluorescence analysis of mitochondrial distribution

The fat body of queen and worker larvae of each developmental stage ($n = 3$) was dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) for 16 h at 4 °C. Subsequently, the samples were rinsed in PBS and embedded in Tissue Tek O.C.T gel (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and sectioned at 14 μ M thickness in a CM1850 cryostat (Leica, Wetzlar, Germany). The sections were placed on slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After adhesion they were hydrated with PBS and Triton X-100 1% (PBST) for 2 h, washed with PBS and incubated in an antibody directed against ATP synthase subunit 5A

(anti-ATP5A antibody produced in mouse, MitoSciences, #MS507; ABCAM, Cambridge, MA, USA) diluted 1:500 in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 16 h at 4 °C. Subsequently, they were washed in PBST and incubated with a secondary antibody (AlexaFluor-568 goat anti-rat, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:1000 in PBS/BSA for 1 h at room temperature. They were counterstained with DAPI and TRITC-phalloidin to reveal nuclei and F-actin, respectively, and mounted for immunofluorescence microscopy (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI; ABCAM, Cambridge, MA, USA). Images were obtained in a TCS SP5 confocal microscope system (Leica, Wetzlar, Germany), and analyzed using its proper software (Leica Application Suite AF 2.6.0 build 7266) and ImagePro-Plus (version 4.5.0.29).

2.3. Transmission electron microscopy

Fat body samples of queen and worker larvae of each stage ($n = 3$) were fixed for 2 h in glutaraldehyde (2.5%) in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.1, containing 0.3 M sucrose for osmotic control. After washes in 0.1 M cacodylate buffer, they were post-fixed for 2 h in 2% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer and dehydrated in an ascending ethanol series (70%–100%). The samples were embedded in Araldite resin and after polymerization sectioned at 80–90 nm in an ultramicrotome. Sections were placed on copper grids and stained with 1% uranyl acetate and lead citrate. Images taken in a transmission electron microscope (JEOL JEM-100 CXII; Tokyo, Japan) were processed for adjusting contrast and brightness in Photoshop CS6 and analyzed in ImagePro-Plus (version 4.5.0.29).

2.4. Citrate synthase activity assay

Citrate synthase activity was measured to estimate actual numbers of mitochondrial functional units. This is important because mitochondria vary widely in shape, size and internal cristae density, so measuring a key enzymatic step is a more accurate method than counting density from sections to assess mitochondrial function and dynamics in comparative studies (Williams et al., 1986). The assay is based on the conversion of oxaloacetate and acetyl-CoA to citrate and SH-CoA and monitors colorimetrically the production of thionitrobenzoic acid. Fat body samples of queen and worker larvae ($n = 4$) were incubated in RIPA lysis buffer (NaCl 0.75 M, SDS 0.5%, Tris 0.25 M, Triton X-100 5%, EDTA supplemented with orthovanadate 100 mM, acid sodium pyrophosphate 100 mM, PMSF 100 mM, leupeptin 1%; all reagents from Sigma, St. Louis, MO, USA), sonicated at 40 Hz for 10 min and then incubated on ice. Ten microliters of the lysates were collected and incubated in 200 μ L of reaction mixture (Tris-HCl 50 mM, DTNB 100 μ M, Triton X-100, pH 8, supplemented with 2.5 μ L of 250 μ M oxaloacetate and 2.5 μ L of 50 μ M acetyl-CoA). The reaction was monitored for 10 min in a Cary 50 Bio® spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) set at 412 nm and 37 °C. The results were normalized by the protein concentration of the respective samples (Bradford, 1976) and analyzed in GraphPrism V 5.0 software. Statistical analyses were performed by two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test ($p < 0.05$).

2.5. Oxygen consumption measurements

Oxygen consumption assays were performed at 37 °C by high-resolution respirometry (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Its proper DatLab software package (Oroboros) was used for data acquisition (at 2 s time intervals) and analysis, including calculation of the time derivative of oxygen concentration, signal deconvolution (dependent on the response time of the

oxygen sensor) and correction for instrumental background oxygen flux (La Guardia et al., 2013; Rossato et al., 2014).

Fat body tissue of queen or worker larvae was incubated in 2.1 mL of MiRO5 respiration buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60 mM L-lactobionic acid, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM D-sucrose, 1 g/L BSA) at 37 °C and the chamber was closed. After determination of respiratory rates in the Routine (R) state, 10 mM succinate was added to measure respiration supported by Complex II-linked substrate (CII state), and 220 μ M ADP to determine the Phosphorylation (P) state. Next, the following modulators of mitochondrial function were sequentially added, oligomycin (1 μ g/mL), an inhibitor of ATP synthase to establish the nonphosphorylating or Leak (L) state, and the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (four additions of 1 μ M each) to determine the state of maximum capacity of the electron transport system (ETS state, E), or, put in other terms, the uncoupled state. A schematic representation of the assay sequence and actual measurements taken during a session are shown in Supplementary Fig. S1.

Upon terminating the assay session, the medium containing the tissue was collected with a pipette and transferred to tubes containing 200 μ L of 8 M KOH. Three aliquots of 1 μ L each were used to quantify total protein content by the Bradford method. The protein results were then used for normalization of the mitochondrial function measurements. The L/E, L/P, P/E, R/E and CII/E ratios were calculated for each individual experiment ($n = 6$ for each developmental stage and caste). Mean and standard deviation for queen and worker overall average ratios across all developmental stages were calculated, and after testing for normality these were statistically analyzed by two-way ANOVA ($p < 0.005$) and a Bonferroni post-hoc test using GraphPrism V 5.0 software, which was also used to prepare the mitochondrial function graphs.

2.6. Expression analysis of candidate genes

Three fat body samples per developmental stage were dissected and homogenized in TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for RNA extraction following the manufacturer's protocol. RNA concentration and quality was assessed by spectrophotometry (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) at 260/280 nm before treatment with RNase free DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove residual DNA. First strand cDNA was synthesized by reverse transcription using the Superscript II enzyme and Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (both from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Mitogenesis-related genes were identified by BLASTP alignments of the respective *Drosophila* genes against database of predicted sequences (Amel_OGS3.2) in the *A. mellifera* (genome, Amel 4.54.5). This retrieved unique orthologous sequences for Transcription Factor A, Mitochondrial (amTFAM), Transcription Factor B1, Mitochondrial (amTFB1), Transcription Factor B2, Mitochondrial (amTFB2) and Estrogen-related Receptor (amERR), shown in Table 1 with their respective primer sequences. Primer searches were done with the aid of the PrimerBLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and those selected were directed against non-conserved regions and covered the junction of two different exons.

Primer efficiencies and specificity were first checked by PCR in a gradient thermocycler (PTC-200, MJ Research, Waltham, MA, USA) and validated by Sanger sequencing of the purified PCR products (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Madison, WI, USA). Sequencing was done using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and M13 forward primer on an ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) automated gene analyzer. The

Table 1

Primer sequences used for expression analysis of mitogenesis-related genes. Shown are the gene names, the BeeBase gene IDs (Amel 4.5), the GenBank accession numbers, and the respective primer sequences for the honey bee genes.

Gene name	BeeBase ID	GenBank ID	Primer sequences	Amplicon size (bp)	Exon position
<i>amTFAM</i>	GB43084	XM_624015.4	F: 5'-CAAGTTTACAGCCCGCAACC-3' R: 5'-GCGTTTGTGTTGCTGTGGA-3'	166	9–10
<i>amTFB1</i>	GB53915	XM_001121333	F: 5'-TGTAATGGCACAAGCGTGA-3' R: 5'-CAAGACCGACATCACTTTTGGT-3'	92	3–4
<i>amTFB2</i>	GB44671	XM_001122259.3	F: 5'-TCAATTTTGGCATTATTCGACA-3' R: 5'-CACATCCAGGAAGTCTTTTCCA-3'	87	2–3
<i>amERR</i>	GB44544	NM_001162516.1	F: 5'-CTTGCCTAGTCTGCGGTGA R: 5'-ATCTCACATCCCATTCGC-3'	93	7
<i>rp49</i>	GB47227	AF441189.1	Endogenous control gene, see Lourenco et al. (2008)	150	

obtained sequences were compared with those of the annotated genes of interest using the BLASTN algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and CodonCode Aligner (v 5.1.5).

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses were set up using 1.5 μ L of cDNA (diluted 1:10), 7.5 μ L of Power SYBR[®] PCR Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.5 μ L of each forward and reverse primer (10 pmol/ μ L) and 5 μ L of deionized water (MilliQ, Millipore, Billerica, MA, USA) completing a final volume of 15 μ L. Reactions were run in a Real-Time PCR StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) system under the following conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, followed by dissociation curve analysis (95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s). For normalization of the biological samples we performed assays using the honey bee *rp49* gene which encodes the ribosomal protein RP49, also named RPL32. Its suitability as endogenous control gene in *A. mellifera* RT-qPCR has been established (Lourenco et al., 2008) and it has previously been used to assay hypoxia gene expression (Azevedo et al., 2011). Details of the RT-qPCR protocol are presented in Table S1 (Supplementary material), following the MIQE guidelines (Bustin et al., 2010).

Each of the three biological samples per developmental stage was assayed in triplicate. Relative transcript levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using one of the fourth-instar worker samples as calibrator for each gene. For statistical analysis the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values were $\log_{10}$ transformed to normalize variation before running two-way ANOVA ($p < 0.05$) and Bonferroni post-hoc tests using GraphPad Prism V 5.0 software.

3. Results

3.1. Mitochondrial density, distribution and morphology in larval fat body

To obtain a general picture on density and distribution of mitochondria in fat body cells of fourth and early fifth-instar queen and worker larvae we targeted the ATP5a subunit of ATP synthase of mitochondria with a commercial antibody. These developmental stages were chosen due to the fact that they represent the transition from a still flexible caste fate in the fourth instar, which then becomes fixed during the feeding phase of the fifth instar (Dedej et al., 1998).

The results showed trophocytes with extensive mitochondrial networks in both castes (Fig. 1). The mitochondrial network of trophocytes still looks rather similar for the two castes in the fourth instar, but then appears to gradually diminish in fifth-instar worker larvae, especially so in the perinuclear region. A strong reduction in mitochondrial density was especially noticeable as worker larvae stopped feeding and entered the cocoon-spinning stage.

These findings were fully corroborated by the ultrastructure analyses of larval fat body, which now offer much more detail on

mitochondrial density, distribution and form. As shown in Fig. 2, fat body trophocytes of queen larvae were much richer in mitochondria already in fourth-instar larvae, thus indicating that these key elements of metabolic regulation already differ before caste fate becomes fully fixed. In early fifth-instar larvae, represented in Fig. 2 by the three sequential feeding stages, the differences became further enhanced, especially so in the cytoplasm beyond the perinuclear area, which, in worker larvae, became void of mitochondria and showed an enrichment in lipid vesicles. In contrast, protein granules became more prominent in queen larvae within the mitochondria-rich perinuclear area.

Although the caste differences in mitochondrial profile were already well established during the growth phase of the fifth instar (Fig. 2), we nonetheless extended the ultrastructure investigation into the cocoon-spinning phase, as it was at this developmental time point when the differences became really apparent in the immunofluorescence images. Supplementary Fig. S2 shows the caste comparisons for the three spinning stages. It is worthy of note that the high mitochondrial density persisted in the perinuclear cytoplasm of queens, in contrast to workers, but protein granules now appeared to be similar in number in their fat body trophocytes. Also, we took a closer look at the second site of mitochondrial aggregates, the area just below the plasma membrane (Supplementary Fig. S3). Interestingly, there appeared to be no major caste difference in terms of mitochondrial density in this area, possibly due to the role of these mitochondria in supplying high energy units for cross membrane transport processes of nutrients and metabolites. This is also evidenced by the close association of mitochondria with the plasma membrane reticular system. A close association with another intracellular membrane system, the perinuclear endoplasmic reticulum, was also observed (Supplementary Fig. S4).

In terms of caste-specific differences in mitochondrial morphology, a finding worthy of note is the appearance of cup-shaped mitochondria in trophocytes of feeding stage fifth-instar queen larvae (Fig. 2). At higher magnification (Supplementary Fig. S5), these mitochondria, which appear ring-shaped in cross sections, contain glycogen granules in the cytoplasm that fills these cups.

While both imaging techniques, the immunofluorescence of ATP synthase subunit 5A and the transmission electron microscopy sections, provided important insights into the distribution and density of mitochondria, they are essentially qualitative in nature, especially for mitochondria which are highly variable in size, shape and, especially so, cristae density. Hence, we used a biochemical assay to obtain data on actual mitochondrial functional units in the fat body of queen and worker larvae. The analysis of citrate synthase activity (Fig. 3) showed that queens have a significantly higher number of mitochondrial functional units at the peak of their growth phase in the fifth instar (F2 and F3), followed by a drastic decrease in the cocoon-spinning stage, when both castes

Fig. 1. Confocal images showing the mitochondrial profile of trophocytes of queen (top row) and worker (bottom row) during caste development of *Apis mellifera*. Mitochondria were identified targeting the ATP5a subunit of ATP synthase with a commercial antibody (green). DAPI-stained nuclei are blue and TRITC-phalloidin-stained F-actin is red. Shown are fourth-instar larvae (L4) and sequential feeding F1, F2 F3) and spinning stages of the fifth larval instar (S1; S2/S3); scale bars: 10 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 2. Ultrastructure micrographs of fat body trophocytes of queen (top row) and worker (bottom row) larvae in the fourth (L4) and feeding stages of the fifth instar (F1, F2 and F3). Queen trophocytes present a higher density of morphological mitochondrial units than workers, especially in the perinuclear area. In addition to superior number, the queen mitochondria also have high-density cristae and are frequently surrounded by endoplasmic reticulum. Glycogen granules (GI), lipid vesicle (L), mitochondria (M), multivesicular granule (mg), nucleus (N), tracheid (T); ring-shaped mitochondria (*) are seen in F2 queen trophocytes. Scale bars: 2 μ m.

were at similar low levels. Though not statistically significant, mean citrate synthase activity was already higher in fourth-instar queen larvae compared to worker. While perfectly well in line with the light and electron microscopy results in terms of evidencing a drastic caste difference, the assays also showed that it is only in queens where mitochondrial functional units actually increase during a crucial stage of caste development, while remaining at basal levels in workers.

3.2. Mitochondrial oxygen consumption

In order to gain insight into mitochondrial functionality in fat body tissue of queen and worker larvae we monitored oxygen consumption using a high-resolution respirometry methodology. The graphic representation shown in [Supplementary Fig. S1](#) shows the time course of oxygen consumption (blue line) in relation to the sequential biochemical interventions (vertical gray bars) of a representative assay session.

Already at the first assay step (Routine), after the fat body tissue

was added to the Oxygraph reaction chamber, the measurements revealed a significantly higher oxygen consumption (flux) in queens for three of the seven developmental stages ([Fig. 4A](#)). For the subsequent assay steps (CII, Phosphorylation, Leak and ETS) the differences between the mitochondrial states of queen and worker samples became even more pronounced, especially so in the fifth-instar feeding stages ([Fig. 4B–E](#)). [Supplementary Fig. S6](#) shows the same data but from a different perspective. Here the sequence of mitochondrial states is represented separately for each developmental stage, again putting in evidence the enhanced response of queen mitochondria to the sequential addition of mitochondrial state modulators.

The elevated oxygen consumption rates seen in queen fat body mitochondria in the Routine state ([Fig. 4A](#)), in which respiration is only dependent on the endogenous mitochondrial substrate, and then in the CII-linked state, supported by added succinate ([Fig. 4B](#)), reflect a high cellular ATP demand, while the high levels seen in the Phosphorylation state indicate their superior capacity of oxidative phosphorylation ([Fig. 4C](#)). In the nonphosphorylating or Leak state

Fig. 3. Citrate synthase assay estimates of mitochondrial functional units in queen and worker fat body tissue during caste development of *A. mellifera*. The bars represent means and SEM of four replicates per developmental stage and caste. Two-way ANOVA with Bonferroni correction revealed highly significant differences for the fifth-instar feeding stages F2 and F3 (*** $p < 0.001$).

electron transfer state (ETS) shown in Fig. 4E. This was promoted by the protonophore CCCP which allows the return of protons back to the matrix, thus accelerating electron transfer and O_2 consumption to the maximal possible rate for each mitochondrial preparation.

To assess this further, we calculated flux control ratios (FCRs) for the different mitochondrial states during the corresponding developmental stages (Fig. 5 and Supplementary Table S2). Such FCRs provide information about the respiratory control of mitochondria. When the Leak state was calculated as a fraction of the ETS and Phosphorylation states (Leak/ETS or Leak/Phosphorylation, respectively, Fig. 5A and B) we found very similar ratios for queens and workers, this indicating similar degrees of coupling for these mitochondrial state parameters in the two castes. Furthermore, the Leak/ETS ratio also revealed that about 40% of the maximum capacity of O_2 consumption is related to Leak (Table S2), while the Phosphorylation/ETS ratio indicates that the capacity of the phosphorylation system accounts for 50–70% of the electron transfer system capacity in both castes (Fig. 5C, Table S2). Moreover, FCR calculation for the Routine/ETS and CII-linked/ETS states (Fig. 5D and E, Table S2) allowed to conclude that the cellular ATP demand in queen fat body only requires about 40% of the maximal electron transfer system capacity, while worker larvae would use about 60%

Fig. 4. Oxygen consumption (oxygen flux) for fat body mitochondria of queen and worker larvae in relation to the sequential addition of mitochondrial function modulators. A) Basal (Routine) oxygen flux measured after adding the mitochondrial preparation to the reaction chamber, B) after adding succinate (CII-linked), C) in the presence of added ADP (Phosphorylation), D) after adding the ATP synthase inhibitor oligomycin (Leak), and E) four sequential additions of CCCP, an uncoupler of the electron transport system in the electron transfer state (ETS). The horizontal axis in each graph shows the respective developmental stage. Data points are means and SEM ($n = 6$). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

(Fig. 4D), the observed elevated O_2 consumption in queens could reflect intrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation, such as that caused by a proton leak. Finally, the mitochondrial respiratory chain of queen fat body cells achieved very high rates for the

of their capacity.

When each mitochondrial respiratory state was viewed separately during development (Fig. 4A–E), it was possible to observe that queen fat body reaches a respiratory capacity peak during the

Fig. 5. Flux control ratios (FCRs) of mitochondrial states for fat body of queen and worker larvae in the sequential developmental stages. FCRs provide information about respiratory control independent of mitochondrial content and cell size. Shown are FCRs for Leak (A), phosphorylation coupling (B), the phosphorylation system (C), routine (D) and CII-linked (E). Two-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

feeding stages, mainly in F2, followed by a decrease in the cocoon-spinning phase when larvae prepare for metamorphosis. In contrast, worker mitochondria essentially maintain the respiratory rate level of the fourth instar throughout the feeding stages of the fifth instar, before these then also show a decrease in the spinning stages. Taken together, these results provide strong evidence that queen larvae have both an elevated mitochondrial content and a higher O_2 consumption in developmental stages critical for caste differentiation, while mitochondrial quality, as revealed through the analysis of the mitochondrial state FCRs, is apparently similar between the two castes.

3.3. Expression of candidate genes related to mitochondrial biogenesis

Initially our intention was to investigate the expression of a *spargel* homolog in bee larvae. *Spargel* and its mammalian homolog PGC1 α is an important transcription factor that controls mitochondrial biogenesis (Mukherjee and Dutta, 2013). However, as we could not unambiguously identify a homolog of the *Spargel* protein in the *A. mellifera* genome, we decided to investigate the expression of other genes related to mitochondrial biogenesis, such as *amTFAM*, *amTFB1*, *amTFB2*, and to nutritional regulation, with *amERR* as candidate (Fig. 6). The transcripts levels of *amTFAM* were higher in queen larvae during the initial stages and decreased thereafter (Fig. 6A). However no statistical difference was found between the two castes. For the other three factors, expression levels were significantly higher in queens during at least one of the three feeding stages, with *amTFB1* strongly overexpressed in the F2 stage (Fig. 6B) and *amERR* in the F1 stage of queens. The third gene, *amTFB2*, was continuously overexpressed (2–4 fold) in fat body of fifth-instar larvae (Fig. 6C), this showing that mitogenesis/

nutritional regulation-related gene expression goes hand in hand with increased mitochondrial number and oxygen consumption in queen larvae.

4. Discussion

Based on the hypothesis that the marked hypoxia response seen in honey bee workers could be related to or even caused by caste-specific differences in the number and functionality of mitochondria during larval development, we here investigated the quantity and localization of mitochondria, the expression of genes potentially driving their biogenesis, as well as the functional state characteristics of mitochondria by means of high resolution respirometry assays. We found clear evidence that the number of mitochondrial morphological and functional units is higher in queen fat body cells compared to worker larvae and that this is directly reflected in their higher metabolism (ATP demand) during critical stages of caste development. These results are in accordance with previous, already several decades old studies that analyzed quantities of mitochondria and respiratory metabolism in whole bodies of honey bee larvae (Melampy and Willis, 1939; Osanai and Rembold, 1968). The fat body is not only the turntable of a bee's intermediate metabolism (Bishop, 1922), it also occupies most part of the body cavity of honey bee larvae (Cruz-Landim, 2009).

In the immunofluorescence (Fig. 1) and ultrastructure analyses (Fig. 2 and Supplementary Figs. S1–S3) we found mitochondria to be concentrated in two main intracellular regions, possibly comprising two functional populations, one beneath the plasma membrane and the other in the perinuclear area. The first mitochondrial population is fully surrounded by the plasma membrane reticular system, a structure described in fat body of several other insects as having the function to increase the area for nutrient

Fig. 6. Transcript levels of mitogenesis-related factors in fat body of queen and worker larvae. Relative quantification of *amTFAM* (A), *amTFB1* (B), *amTFB2* (C) and *amERR* (D) expression by RT-qPCR. Shown are means and SEM of three biological samples per stage and caste, each analyzed in triplicate. Relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using *rp49* expression for normalization and one of the fourth-instar worker samples as calibrator for each gene. Statistical significance was analyzed by two-way ANOVA and a Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

translocation into the cell (Locke, 1986; Roma et al., 2010). Endocytotic vesicles seen in bee fat body trophocytes are thought to be involved in such nutrient uptake from hemolymph during development (Cruz-Landim, 2009), and mitochondria associated with the plasma membrane reticular system possibly provide the ATP units needed for this transport. The second mitochondrial population, embedded within a network of perinuclear endoplasmic reticulum or dispersed within the perinuclear cytoplasm, is possibly involved in providing energy for a wide range of metabolic conversion processes. So the position of these mitochondrial populations suggests strategic localization differences of these organelles to provide locally needed energy and reduction equivalent units.

An interesting observation was the appearance of cup-shaped mitochondria, which were exclusively found in queen trophocytes (Fig. 2 and Fig. S4). This peculiar shape is evolutionary conserved and is thought to be associated with the exposure of mitochondria to stressful conditions (Ding et al., 2012; Ponomareva and Polygalova, 2012). Experimentally, this morphology can be induced when healthy mitochondria are exposed to uncoupling drugs that directly affect mitochondrial function (Ding et al., 2012), and two protein families, Parkin and mitofusins are known to regulate this mitochondrial shape transition (Ding et al., 2012). The question is, what may be such stressful condition that provokes this

mitochondrial phenotype in queen larvae? Could this possibly be related to the higher mitochondrial oxidative phosphorylation capacity and, hence, a higher level of reactive oxygen species (ROS)?

Mitochondrial intracellular distribution and mitochondrial functional unit number in fat body cells (Fig. 3) were found to increase together with the tissue's oxidative phosphorylation capacity (Fig. 4, Supplementary Fig. S6) during the fifth instar, especially so in queen larvae, while they were still fed by nurse bees. Subsequently, these three parameters declined as the larvae stopped feeding and entered the cocoon-spinning phase. Subsequently, in the prepupal stage, the larval fat body cells will undergo histolysis, releasing all their content into the body fluid (Arrese and Soulages, 2010; Bishop, 1922). Hence, the observed decrease in mitochondrial number and phosphorylation capacity in cocoon-spinning larvae would follow the preparatory steps for the metamorphosis process of honey bees. We summarize these results in Fig. 7.

So as to gain deeper insight into caste differences in mitochondrial functionality we calculated mitochondrial flux control ratios (FCRs), which express respiratory control independent of mitochondrial content and cell size. We found that approximately 40% of the maximum capacity of O_2 consumption is related to the Leak state in both castes (Fig. 5 and Supplementary Table S2), which could reflect intrinsic uncoupling as compensation for a proton

Fig. 7. Schematic representation of the caste-specific changes in mitochondrial distribution and number in fat body cells of *Apis mellifera* queen and worker larvae. Prior to the fourth instar, trophocyte ultrastructure for the two larval types is still similar, but under the influence of differential larval feeding regimes, differences in mitochondria distribution and number of mitochondrial functional units become apparent. These are especially pronounced during the feeding stages of the fifth larval instar, when the growth rates of queen larvae by far exceed those of worker larvae. Upon entering the cocoon-spinning phase and preparing for metamorphosis, the two larval types again look more similar to each other in terms of mitochondrial distribution and number, except for the presence of cup-shaped mitochondria (denoted in brown), which are exclusively seen in queen fat body. Mitochondrial number was quantified by a citrate synthase assay; the blue line shows the data for queen and the red line for worker fat body. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

leak, cation cycling (Ca^{2+} , K^{+}), and/or oxygen used to produce reactive oxygen species (ROS) (Pesta and Gnaiger, 2012). This means that, even though queen larvae have more mitochondria and higher O_2 consumption, the two castes are essentially similar in terms of mitochondrial efficiency. Furthermore, although mitochondrial ATP production is higher in queens (Fig. 5), their maximum mitochondrial electron transfer system capacity is actually lower than that of workers, as reflected by their 20% lower Routine/ETS FCR. Put in other words, it is possible to conclude that the physiological demand for oxygen by queen mitochondria is lower than that of worker larvae. One of the reasons may be that the substrates available for oxidative phosphorylation in queen larvae are more energy rich, that queens make more use of metabolic substrates other than carbohydrates for ATP production, or that the sheer quantity of royal jelly that they receive drives up their energy metabolism.

From these considerations we hypothesize that such differences in quantity and/or quality of energy substrates could directly affect mitochondrial number and morphology in the central organ of a bees intermediary metabolism. For instance, it is known that food deprivation in mammals promotes mitochondrial fission, while a high-fat diet promotes mitochondrial fusion and biogenesis by increasing the mitochondrial area (Baltzer et al., 2010; Dietrich et al., 2013). Hence, the higher concentration of lipids and sugar in royal jelly (Asencot and Lensky, 1988; Wang et al., 2016) could be causally related to both the higher mitochondrial number and consequently higher oxidative phosphorylation levels observed in queen fat body. Furthermore, queen larvae are fed by nurses workers approximately 10 times more frequently than workers larvae (Lindauer, 1952). At this point it is also interesting to ask whether these differences in mitochondrial number and functionality related to caste differentiation in the larval phase may be causally related to the differences seen later on in the mitochondrial energy metabolism of adult honey bees. Whereas oxidative stress was seen to diminish with age in workers fat body cells (Hsu

and Hsieh, 2014), the opposite occurs in queens, as older queens had higher levels of ROS and enzyme activities related to oxidative stress, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase, compared to young queens (Hsieh and Hsu, 2013). Nonetheless, when normalized against mitochondrial density, the mitochondrial energy metabolism, as well as the transcript levels for the ATP synthase and NADH dehydrogenase 1 encoding genes were similar in young and old queens (Hsu and Lu, 2015).

While differences in the use of energy substrates provided via the differential dietary regimes both in the larval and adult life cycle of honey bee queens and workers could directly affect mitochondrial oxygen consumption, the caste differences in mitochondrial number are likely to involve the expression of transcription factors that control mitochondrial biogenesis. Here we observed higher expression levels for two of the three analyzed mitogenic transcription factor genes (*amTFB1* and *amTFB2*, but not *amTFAM*) in queen larval fat body (Fig. 6). Especially *amTFB2* expression was significantly higher throughout the fourth and all the premetamorphic stages of the fifth instar. The *amTFB1* gene was overexpressed in early fifth-instar queen larvae. These results are in full accordance with our physiological and morphological results and lead to infer that these transcription factors could be *bona fide* regulators of the mitochondrial phenotype differences seen in the fat body of queen and worker larvae.

The estrogen-related receptor, ERR, is reported to be an essential regulator of carbohydrate catabolism in *Drosophila* larvae, controlling the expression of several genes in the glycolysis and pentose phosphate pathways. This nuclear receptor also up-regulates some tricarboxylic acid cycle intermediates, as well as ATP and lactate levels (Tennesen et al., 2011). This nuclear receptor is also linked to HIF-associated and non-associated control responses (Li et al., 2013). Strikingly, the lower levels of *amERR* gene expression seen in honey bee worker larvae (Fig. 4D) apparently contradict what is known about ERR functions in *Drosophila*. Nonetheless, as we have previously shown (Hartfelder et al., 2015),

connectivities in key nutrient-sensing pathways appear to have been rewired in *Apis mellifera* as a consequence of the evolution of two phenotypically different castes with distinct life histories, highly fertile and long-lived queens and facultatively sterile and short-lived workers. Evidently, this represents a clear disruption in a central metazoan life history dogma, the reproduction/somatic maintenance trade-off (Flatt et al., 2013). We speculate that the difference seen in *amERR* expression levels between queens and workers may possibly have its origin in intrinsic responses to the different nutritional environments of the larvae, not only in food quantity but also in quality, such as the relative amounts of lipids, carbohydrates and proteins (Wang et al., 2016). Furthermore, recent studies revealed interesting differences in the microRNA composition of these larval diets (Guo et al., 2013) and in the larval body (Ashby et al., 2016), which could both modulate the expression of the honey bee estrogen receptor-related gene. The actual role of this gene in the caste differentiation process, however, still remains to be explored.

Finally, as there are no reasons to assume that queen and worker larvae may be exposed to different oxygen environments while raised in open brood cells right next to each other, it is interesting to speculate on how the hypoxia response and the mitochondrial phenotype differences may actually be connected. Seemingly, although reared under the same external oxygen levels, the fat body cells of worker larvae apparently maintain lower rates of oxygen consumption at higher physiological demand. Could this physiological state be similar to the Warburg effect seen in tumor cells? These cells use aerobic glycolysis with reduced mitochondrial oxidative phosphorylation even at adequate availability of oxygen (Warburg, 1956), and HIF-1 overexpression is considered critical for their metabolic adaptation to hypoxia (Kim et al., 2006). HIF-1 not only induces the overexpression of genes encoding glycolytic enzymes, it also increases their activity and regulates the hypoxic induction of lactate dehydrogenase A (Firth et al., 1995). The metabolic consequence is an increased conversion of glucose to pyruvate and, subsequently, increased production of lactate (Kim et al., 2006). With this in mind, it is possible to speculate and associate the higher expression of hypoxia genes seen in honey bee worker larvae, the lower number of mitochondrial functional units and their lower oxidative phosphorylation levels with a possible Warburg effect occurring during the development of worker larvae.

We believe that future work that involves the measurement of intracellular levels of calcium, reactive oxygen species and lactate, the expression analysis of genes related with mitochondrial fusion and fission, as well the investigation of central nutrient sensing molecules will provide a better understanding of the molecular dynamics involved in honey bee caste development, especially on how the different nutrient stimuli mechanistically promote critical changes in cellular physiology and gene expression. While taking up on a theme in honey bee caste development that was essentially overlooked, or better to say neglected for decades, including by us, our current results are now a step in the direction of an integrative view on the biochemistry and genomics of the honey bee larval metabolism. It is already possible to conclude that the lower number of mitochondrial functional units and diminished oxidative metabolism seen in the fat body cells of worker larvae is consistent with the higher endogenous hypoxia response, and that mitochondrial biogenesis is likely to play a major role in the caste differentiation process in *A. mellifera*.

Acknowledgment

We thank the technicians Vani M. Alves, Elizabeth Rosa Milani, Maria Dolors Seabra Ferreira, Maria Teresa Picinoto Maglia and José A. Maulin from the Histology, Confocal Microscopy (LMMC FAPESP

proj. 2004/08868-0) and Electron Microscopy facilities of FMRP-USP for their help with tissue preparations, Carlos Porto Dechandt and Anderson de Oliveira Souza for help with oxygen consumption measurements, Dr. Karina R. Guidugli-Lazzarini for advice with transcript quantification, and Luiz R. Aguiar (Dept. Genetics of FMRP-USP) for the rearing of queen larvae. The study received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 2010/17259-9 and 2013/24733-7).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.04.001>.

References

- Arrese, E.L., Soulaiges, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.
- Asencot, M., Lensky, Y., 1988. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochem.* 18, 127–133.
- Ashby, R., Forêt, S., Searle, I., Maleszka, R., 2016. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Sci. Rep.* 6, e18794.
- Azevedo, S.V., Hartfelder, K., 2008. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development – differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae. *J. Insect Physiol.* 54, 1064–1071.
- Azevedo, S.V., Caranton, O.A.M., de Oliveira, T.L., Hartfelder, K., 2011. Differential expression of hypoxia pathway genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *J. Insect Physiol.* 57, 38–45.
- Baltzer, C., Tiefenbock, S.K., Frei, C., 2010. Mitochondria in response to nutrients and nutrient-sensitive pathways. *Mitochondrion* 10, 589–597.
- Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simoes, Z.L.P., Maleszka, R., 2007. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.* 7, e70.
- Bishop, G.H., 1922. Cell metabolism in the insect fat-body. I. Cytological changes accompanying growth and histolysis of the fat-body of *Apis mellifica*. *J. Morphol.* 36, 567–601.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72, 248–254.
- Bustin, S.A., Beaulieu, J.F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F.S., Olsvik, P.A., Penning, L.C., Toegel, S., 2010. MIQE précis: practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol. Biol.* 11, e7474.
- Callier, V., Hand, S.C., Campbell, J.B., Biddulph, T., Harrison, J.F., 2015. Developmental changes in hypoxic exposure and responses to anoxia in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 218, 2927–2934.
- Cameron, R.C., Duncan, E.J., Dearden, P.K., 2013. Biased gene expression in early larval development. *BMC Genom.* 14, e903.
- Centanin, L., Gorr, T.A., Wappner, P., 2010. Tracheal remodelling in response to hypoxia. *J. Insect Physiol.* 56, 447–454.
- Corona, M., Estrada, E., Zurita, M., 1999. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 202, 929–938.
- Cruz-Landim, C., 2009. *Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas*. Editora Unesp, São Paulo.
- Dedej, S., Hartfelder, K., Aumeier, P., Rosenkranz, P., Engels, W., 1998. Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apic. Res.* 37, 183–190.
- Dekanty, A., Lavista-Llanos, S., Irisarri, M., Oldham, S., Wappner, P., 2005. The insulin-P13K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF- α /Sima. *J. Cell Sci.* 118, 5431–5441.
- Dietrich, M.O., Liu, Z.W., Horvath, T.L., 2013. Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate AgRP neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* 155, 188–199.
- Ding, W.X., Li, M., Biazik, J.M., Morgan, D.G., Guo, F.L., Ni, H.M., Goheen, M., Eskelinen, E.L., Yin, X.M., 2012. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *J. Biol. Chem.* 287, 42373–42378.
- Dominy, J.E., Puigserver, P., 2013. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a015008.
- Eder, J., Kremer, J.P., Rembold, H., 1983. Correlation of cytochrome-C titer and respiration in *Apis mellifera* – adaptive response to caste determination defines workers, intercastes and queens. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 76, 703–716.
- Firth, J.D., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J., 1995. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response

- elements. *J. Biol. Chem.* 270, 21021–21027.
- Flatt, T., Amdam, G.V., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W., 2013. Life history evolution and the polyphenic regulation of somatic maintenance and survival. *Q. Rev. Biol.* 88, 185–218.
- Friedman, J.R., Nunnari, J., 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.
- Gleyzer, N., Vercauteren, K., Scarpulla, R.C., 2005. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol. Cell Biol.* 25, 1354–1366.
- Guo, X., Su, S., Skogerboe, G., Dai, S., Li, W., Li, Z., Liu, F., Ni, R., Guo, Y., Chen, S., Zhang, S., Chen, R., 2013. Recipe for a busy bee: microRNAs in honey bee caste determination. *PLoS One* 8, e81661.
- Hartfelder, K., Engels, W., 1998. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Curr. Top. Dev. Biol.* 40, 45–77.
- Hartfelder, K., Guidugli-Lazzarini, K.R., Cervoni, M.S., Santos, D.E., Humann, F.C., 2015. Old threads make new tapestry – rewiring of signalling pathways underlies caste phenotypic plasticity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Adv. Insect Physiol.* 48, 1–36.
- Hsieh, Y.S., Hsu, C.Y., 2013. Oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuvenation Res.* 16, 295–303.
- Hsu, C.Y., Hsieh, Y.S., 2014. Oxidative stress in the trophocytes and fat cells of worker honeybees during aging. *Biogerontology* 15, 129–137.
- Hsu, C.Y., Lu, C.Y., 2015. Mitochondrial energy utilization maintains young status in the trophocytes and oenocytes of old queen honeybees. *Apidologie* 46, 583–594.
- Jindra, M., Palli, S.R., Riddiford, L.M., 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 181–204.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.
- La Guardia, P.G., Alberici, L.C., Ravagnani, F.G., Catharino, R.R., Vercesi, A.E., 2013. Protection of rat skeletal muscle fibers by either L-carnitine or coenzyme Q10 against statins toxicity mediated by mitochondrial reactive oxygen generation. *Front. Physiol.* 4, e103.
- Li, Y., Padmanabha, D., Gentile, L.B., Dumur, C.I., Beckstead, R.B., Baker, K.D., 2013. HIF- and non-HIF-regulated hypoxic responses require the estrogen-related receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 9, e1003230.
- Lindauer, M., 1952. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vergl. Physiol.* 34, 299–345.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25, 402–408.
- Locke, M., 1986. The development of the plasma membrane reticular system in the fat body of an insect. *Tissue Cell* 18, 853–867.
- Lourenco, A.P., Mackert, A., Cristino, A.D., Simoes, Z.L.P., 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39, 372–385.
- Melampy, R.M., Willis, E.R., 1939. Respiratory metabolism during larval and pupal development of the female honeybee (*Apis mellifica* L.). *Physiol. Zool.* 12, 302–311.
- Michelette, E.R.D., Soares, A.E.E., 1993. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 24, 431–440.
- Michener, C.D., 1974. The Social Behavior of the Bees. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Mukherjee, S., Duttaroy, A., 2013. Spargel/dPGC-1 is a new downstream effector in the insulin–TOR signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 195, 433–441.
- Osana, M., Rembold, H., 1968. Entwicklungsabhängige Enzymaktivitäten in den Mitochondrien von Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 22–31.
- Palikaras, K., Tavernarakis, N., 2014. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Gerontol.* 56, 182–188.
- Patel, A., Fondrk, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K., Amdam, G.V., 2007. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One* 2, e509.
- Pesta, D., Gnaiger, E., 2012. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In: Palmeira, C.M., Moreno, A.J. (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics*. Humana Press, New York, pp. 25–58.
- Ponomareva, A.A., Polygalova, O.O., 2012. Changes in mitochondrial shape in wheat root cells exposed to mitochondrial poisons. *Russ. J. Plant Physiol.* 59, 428–433.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K., 1990. Caste and metamorphosis – hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 31–38.
- Rembold, H., 1987. Caste-specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 17, 1003–1006.
- Rembold, H., Czoppelt, C., Rao, P.J., 1974. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 20, 1193–1202.
- Roma, G.C., Bueno, O.C., Camargo-Mathias, M.I., 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron* 41, 395–401.
- Rossato, F.A., Zecchin, K.G., La Guardia, P.G., Ortega, R.M., Alberici, L.C., Costa, R.A.P., Catharino, R.R., Graner, E., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2014. Fatty acid synthase inhibitors induce apoptosis in non-tumorigenic Melan-A cells associated with inhibition of mitochondrial respiration. *Plos One* 9, e101060.
- Scarpulla, R.C., 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88, 611–638.
- Schmidt Capella, I.C., Hartfelder, K., 1998. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J. Insect Physiol.* 44, 385–391.
- Tennessen, J.M., Baker, K.D., Lam, G., Evans, J., Thummel, C.S., 2011. The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metab.* 13, 139–148.
- The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.
- Wang, Y., Ma, L., Zhang, W., Cui, X., Wang, H., Xu, B., 2016. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47, 48–56.
- Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Wheeler, D.E., Buck, N., Evans, J.D., 2006. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15, 597–602.
- Williams, R.S., Salmons, S., Newsholme, E.A., Kaufman, R.E., Mellor, J., 1986. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 261, 376–380.
- Wirtz, P., Beetsma, J., 1972. Induction of caste differentiation in the honey bee (*A. mellifera*) by juvenile hormone. *Entomol. Exp. Appl.* 15, 517–520.

ANEXO C- Manuscrito em preparação

Queens invest in high levels of antioxidants to guarantee homeostasis during the caste differentiation process in *Apis mellifera* L.

**Douglas Elias Santos¹; Anderson de Oliveira Souza², Gustavo Jacomini Tibério¹,
Luciane Carla Alberici²; Klaus Hartfelder^{1*}**

¹Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

²Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail address: klaus@fmrp.usp.br (K. Hartfelder)

Co-author E-mail addresses: douglaselias@usp.br (D. E. Santos); andersonosouza@uol.com.br (A. O. Souza); gustiberiopro@gmail.com (G. J. Tibério); alberici@fcrp.usp.br (L.C. Alberici)

Keywords: honeybee, queen development, hypoxia response, reactive oxygen species, antioxidant genes

1. Introduction

Apis mellifera is a species of eusocial bee whose female individuals are divided into castes, workers and queens, which are respectively responsible for the maintenance and reproduction of the colony. These two castes originate from the same larva, containing even genotype, capable of responding to external nutritional stimuli during the development process (Rachinsky *et al.*, 1990). Thus, if the larvae receive significant quantities of royal jelly during initial stages of development, a secretion released from hypopharyngeal and mandibular glands of the nursing workers, will develop in queens. On the other hand, if the same larva receives worker's jelly, a mixture of honey, pollen and glandular secretion will develop into worker (Hartfelder *et al.*, 2015). As consequence this differential feeding program adult queens have higher life span, larger body size and highly functional ovaries which guarantees the reproductive function of the colony while adult workers have short life span, smaller body size and facultatively sterile and small ovaries (Hartfelder e Engels, 1998; Michener, 1974).

The process of how the stimuli from the differential feeding that larvae receive are converted into gene and physiological response patterns gained its first insights after the identification that high levels of juvenile hormones in queens were determinants for cast differentiation process in *A. mellifera* (1, 2). High levels of juvenile hormone would contribute to the prevention of cell death of ovary cells and reproductive function of queen in a colony (3). Other insights emerged after the study of the pathways of nutrient detection and cell growth control, especially with an introduction of studies involving nutrient sensing pathways such as Insulin (IIS) -TOR signaling. Within the IIS pathway, the first results shown that early larvae diet could modulate the temporal expression pattern of the two predict insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) being amILP-1 overexpressed and related to higher JH levels in queen larvae and amILP-2 overexpressed in worker larvae (4). Contrary to expected the two genes encoding the insulin receptors are less expressed in queen larvae, just as this caste enter their major growth phase (de Azevedo and Hartfelder, 2008). The insulin route interacts with other growth-regulating signaling pathway such as TOR route. Although in the TOR gene knockdown the larvae created with royal jelly differ in workers, TOR levels are lower in queen larvae when compared to worker larvae (Hartfelder *et al.*, 2006; Patel *et al.*,

2007). Inconsistencies were also seen regarding genes that communicate with the IIS / TOR route to the amFOXO gene and the amEGFR receptor (Hartfelder et al., 2015).

All seemingly paradoxical results encouraged our group to explore other hypotheses that would link the activity of the insulin pathway with the regulation of growth and larval development. Thus based on modulation of hypoxia-IIS pathway via TOR studied in fruitfly larvae (5), Azevedo, Caranton (6) put in evidence an over expression of three hypoxia core gene *Amfatiga*, *Amsima* and *Amtango* in workers larvae, suggesting endogenous hypoxia response as possible influencing factor of caste differentiation. These results are intriguing since queen and worker larvae receive the same oxygen levels because both are reared next to each other in open brood cells.

Based on ancient studies demonstrating metabolic differences in queen and worker larvae (7, 8) together with evidences of hypoxia response through nutrient-sensing pathways can modulate cellular metabolism and this in turn to influence mitochondrial morfo-physiology (9-11), Santos et al. (2016) founded evidences of lower number of mitochondrial functional units and diminished oxidative metabolism seen in the fat body cells of worker larvae is consistent with the higher endogenous hypoxia response and could be associated with a possibly Warburg effect.

Cells under Warburg effect produce high quantity of lactate due the use of aerobic glycolysis with reduced mitochondrial oxidative phosphorylation even at adequate availability of oxygen (12). In this condition the overexpression of HIF-1 α (*Amsima*) is critical for their metabolic adaptation to hypoxia and induction of lactate dehydrogenase (13). Increasing only HIF-1 α mRNA levels is not enough to hypoxia induction but is essential the stabilization of oxygen sensitive protein. This process has been associated to mitochondria-derived reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, that prevent the proteasomal degradation of HIF-1 α through the inhibition prolyl hydroxylases (14-17).

Superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) is mainly produced as aerobic respiration products during electron transfer reactions at respiratory chain or by action of NADPH oxidases (18, 19) and for some time it has been described as protagonist on oxidative stress damaging lipids, proteins and genetic material (20). Cells uses antioxidant defenses layers in order to neutralize the damage effect of ROS. The first defense line is mainly

represented by enzymes that detoxify $O_2^{\bullet-}$ into less reactive species (H_2O_2) such as mitochondrial and cytoplasmatic superoxide dismutases, MnSOD and CuZnSOD respectively.. The second barrier include catalase, glutathione peroxidase and reduced glutathione protein (GSH) (21).Although inducing oxidative stress it has become apparent that ROS also have signaling functions that allow adaptations to changes in nutrient availability and oxidative environment (22).

In this present study we investigate if the Warburg effect as well oxidative stress and redox signaling could contribute with caste differentiation in *A. mellifera*. As a first step we assayed measurement of lactate in fat body cell. Next we investigate ROS production, the respective transcript levels of antioxidant enzymes and how this balance could affect de redox environment of fat body cell throughout the differentiation caste process.

2. Material and methods

2.1.Honey bee larvae

The fat body was dissected from fourth and fifth-instar larvae staged according to (1, 23). Here they comprised fourth-instar larvae (L4) and the first four substages of the fifth larval (L5) instar, covering three phases of feeding (F1, F2, F3) and the first substage cocoon-spinning stages (S1) during which the larvae gradually void their gut before they become prepupae. Queen larvae were reared by a standard apicultural procedure from newly hatched larvae transferred into a partially queenless hive, while worker larvae were sampled directly from hives of Africanized hybrid honey bees (*A. mellifera*) kept in the experimental apiary of the Department of Genetics, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

2.2.Lactate levels

Fat body of three biological samples from each caste and larval phase were dissected, mechanically macerated with pistil aid and separated into two aliquots. The first aliquot was ultracentrifuged at 12,000 x g on hold microtubes for higher protein 10kDa (Vivaspin 2 10000 MWCO PES, GE Healthcare). The samples were then incubated in 96-well assay plates using the lactate-specific kit (MAK064, Sigma). The assay followed the protocol provided by the manufacturer. The reaction was read at

570nm of absorbance. The second aliquot was subjected to the Bradford test for protein measurement and used for the normalization of lactate data.

2.3. H_2O_2 production

Three samples of fat body from each developmental stage from queen and worker larvae were dissected and placed into 2 mL of MiR05 respiration buffer (20 mM HEPES, 10 mM KH_2PO_4 , 110 mM sucrose, 20 mM taurine, 60 mM K-lactobionate, 0.5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2$, 1 g/L fatty acid-free BSA, pH 7.1) at 37 °C, followed by the addition of 4 μ L of Horseradish Peroxidase (0.1 U / mL) and 2 μ L of 50 μ M Amplex® Red Hydrogen Peroxide / Peroxidase Assay Kit - cat. A22188). After curve stabilization 40 nM of pyruvate was added to the reaction. The reaction was incubated in Model F-4500 Hitachi fluorescence spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) under excitation/emission of 530/560 nm with constant stirring for 10 min. The data were normalized by the total amount of protein from the reaction by measuring by the Bradford method. Sequential addition of hydrogen peroxide (10 μ M) was used to assemble the standard curve.

2.4. Expression analysis of candidate genes

We studied antioxidant-encoding genes directly involved in the degradation and neutralization of superoxide radicals and H_2O_2 . Primers sequence of manganese-dependent superoxide dismutase (*amMnSOD*), cytoplasmic Cooper and zinc-dependent superoxide dismutase 1 (*amCuZnSOD*), glutathione peroxidase (*Gtpx-I*), catalase (*amCat*) and glutathione S-transferase-1 (*amGst-I*) were used in accord to the Corona et al.,(2005) (**Table 1**). Primer efficiencies and specificity were first checked by PCR in a gradient thermocycler (PTC-200, MJ Research, Waltham, MA, USA).

For analyses three fat body samples per developmental stage were dissected and homogenized in TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for RNA extraction following the manufacturer's protocol. RNA were treated with RNase free DNase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove residual DNA. First strand cDNA was synthesized by reverse transcription using the Superscript II enzyme and Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (both from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analyses were set up using 1.0 μ L of cDNA (diluted 1:10), 5 μ L of Power SYBR[®] PCR Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.5 μ L of each forward and reverse primer (10 pmol/ μ L) and 3 μ L of deionized water (MilliQ, Millipore, Billerica, MA, USA) completing a final volume of 10 μ L. Reactions were run in a Real-Time PCR StepOne Plus (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) system under the following conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, followed by dissociation curve analysis (95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s). For normalization of the biological samples we performed assays using the honey bee *rp49* gene which encodes the ribosomal protein RP49 (25).

Each of the three biological samples per developmental stage was assayed in triplicate. Relative transcript levels were calculated through same threshold using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (26) using one of the fourth-instar worker samples as calibrator for each gene. For statistical analysis the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values were submitted to two-way ANOVA ($p < 0.05$) and Bonferroni post-hoc tests using GraphPad Prism V 5.0 software.

2.5. Protein carbonyl and Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels

Protein carbonyl and reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels were assessed in the fat body homogenates from five samples of queen and worker larvae in cold 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), centrifuged for 1500xg for 10 min at 4°C and collected the supernatant containing proteins. Protein carbonyl groups was assessed by the spectrophotometric (at 340nm) in a spectrophotometer (Cary 50MPR, Varian Ltd., Melbourne, Australia) and measured through the selective binding of 2,4-dinitrophenyl hydrazine to protein carbonyl groups (27). Differently, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were measured separately from the same individuals by the fluorimetric (excitation/emission at 350/420 nm) ortho-phthalaldehyde method (28) in a spectrophotometer (Synergy 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA). The data obtained were normalized by the protein concentration of each sample.

2.6. Statistical analyses

Data were analyzed statistically by two-way ANOVA ($p < 0.005$) and post-hoc Bonferroni test using GraphPad ©Prism 5.01 software (San Diego, CA, USA), which was also used to prepare the graphs.

3. Results

In order to investigate if the Warburg effect could contribute with caste differentiation in *A. mellifera*, we quantified the level of lactate throughout of larval development on both castes (**Figure 1**). Lactate levels could infer about induction of glycolysis process in cells. Interestingly, the results show fat body cells of queen and worker larvae apparently produce the same quantity of lactate; workers $17.98 \text{ pmol}/\mu\text{g} \pm 21.95$ and queens $15.27 \text{ pmol}/\mu\text{g} \pm 9.58$ (mean $\pm$ SD). Although fat body cells of worker larvae have modest variations in the lactate levels during development the same tissue on queen larvae don't follow this pattern showing a significant decrease on lactate levels during transition from four to fifth larval instar (**Figure 1**).

These results provided scope for other metabolic processes that could affect caste development in response to differential feeding. Reactive oxygen species (ROS) are potential candidates to response the differential feeding program and it could affect the larval development due oxidative stress and signaling role. So the higher mitochondrial density observed during queen larval development (8, 29) could imply on larger production of ROS. In order to gain insight on this hypothesis we quantify the production of H_2O_2 by fluorimetric method. The results shown that queen and worker larvae haven't high differences on H_2O_2 rate production just presenting twice the production of H_2O_2 in fat body cells in some larval stages of queen (F1 and F3) but without statistical differences (**Figure 2**). However fat body mitochondria of worker larvae have shown higher H_2O_2 production on early stages decreasing throughout of larval development when stimulated with pyruvate. In contrast fat body mitochondria of queen larvae responses the same way independently of larval stage (**supplementary Figure S1**).

The previous results have been shown to be interesting and lead us to question: Why the fat body of the queen larvae have the same levels of ROS production already that larvae of queens receive a great quantity of food, which reflects in the high mitochondrial oxidative metabolism and growth rate? Antioxidants proteins are

potential candidate to prevent the oxidative stress and could contribute to physiological homeostasis during larval development. To explore this hypothesis we decide to investigate the expression of gene related to antioxidant proteins such *amMnSOD*, *amCuZnSOD*, *amCatalase*, *amGtpx* and *amGst-1*. Interestingly the transcript levels of mitochondrial *amMnSOD* and *amCatalase* have apparently same pattern within the caste but differentiating between queens and workers (**Figure 3 A-B**). At first fat body of queen larvae have low expression of this two genes during the initial stages, reaching a peak during feeding stage, increasing 4-6 fold, and decreased thereafter. Differently workers shown lower transcriptional levels during initial stages just increasing during last stages. The transcript levels of cytoplasmatic superoxide dismutase (*amCuZnSOD*) initially are higher in fat body of queen during fourth larval instar, decreasing on the next stages when it reaches below worker values (**Figure 3 C**). Transcript levels of *amGtpx* gene follow the same level expression on both castes evidencing high values only fourth instar of queen larvae (**Figure 3 D**). The levels of *amGst1* gene were higher on queen larvae and are shown on **Figure 3 E**. In order to better understand our results the same genes analyzed were plotted in a single graph separated by castes (**supplementary Figure S3**).

ROS could lead to damage on cellular biomolecules as lipids, genetic material and proteins generating oxidative stress and changing the redox environment. An indirect way to determine the level of this oxidative stress in fat body cells and a possible effect of this physiological condition is identifying the levels of protein carbonylation. The quantification of protein carbonyl groups in fat body cells of queen larvae shown elevated levels in the fourth instar decreasing and remaining constant on next stages (**Figure 4**). Workers in turn decrease the oxidative stress during the last three stages analyzed. Although the oscillations within each caste queens and workers converge to equal values of protein carbonylated as they prepare for entry into cocoon-spinning stages.

The quantification of the glutathione (GSH, reduced form) and glutathione disulfide (GSSG, oxidized form) has been considered as an important indicator of redox state of environment and usefully to study of oxidative stress in cells (30). In order to better understand our previous results we quantify the levels of GSH and GSSG of queen and worker larvae and calculated the redox state by GSH/GSSG ratio (**Figure 5**). The GSH and GSSG levels are shown separately on the **supplementary Figure S4**. The

results corroborated the results founded to worker larvae in which is observed a peak of GSH/GSSG ratio on feeding stage 1 and decrease the parameters during the last three stages analyzed. Queens in turn haven't significant oscillations although both castes converge to equal values on late stages.

4. Discussion

Based on the hypothesis that the metabolic changes could be related the caste differentiation process in *A. mellifera* as a result to the differential feeding program we here investigated the possible influence of Warburg effect and oxidative stress on this process. Warburg effect is associated with reprogramming of cellular metabolism toward aerobic glycolysis producing high quantity of lactate even at oxygen availability (31). Here we show that the similar levels of lactate among fat body of queen and worker larvae suggest a normal condition and point to other hypothesis that better describe the metabolic changes associated with higher transcript levels of hypoxia related genes observed during development of workers larvae (**Figure 1**). However it is worth mentioning that lactate levels decreased four fold during transition from fourth to fifth instar of queen larvae (a slight decrease is also observed in worker larvae but it is not maintain constant on next stages) and this matches with same window timing when occurs initial increase on mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in the fat body cells (29). This could support a possible metabolic shift from glycolytic to oxidative phosphorylation state when it has begun the mainly period that larvae receive large amount of jelly.

Here we shown clearly that fat body of queen larvae have higher expression levels of antioxidant genes than worker larvae at and that both caste invest on expression of two mainly antioxidant barriers: intra-mitochondrial superoxide dismutase (*MnSOD*), that converge the radical in to hydrogen peroxide, and catalase, that neutralize this hydrogen peroxide in to water. This fact associated with the lower expression levels of the intra-citoplasmatic superoxide dismutase gene (*CuZnSOD*) is possible to infer that most of the H_2O_2 is produced within the mitochondria in both castes. Despite the similarities it is important to note that queen larvae apparently have different metabolic strategies in response to differential feeding inasmuch as worker larvae. The high concentration of sugar and lipids in the royal jelly and the large amount of food that the larva received inevitably speed growth rate up within a shorter

developmental timing through high mitochondrial oxidative phosphorylation to generate ATP (29, 32, 33). Thus in order to avoid possible damages caused by oxidative stress from reactive mitochondrial oxygen species the queen larvae control the genetic expression of the antioxidant genes differently during the larval stages analyzed. At first lower levels of catalase and cytoplasmatic and intra-mitochondrial superoxide dismutase genes are enough to keep low H_2O_2 levels (similar to worker levels) during fourth instar of queen larvae (**Figure 2, 3 and S3**). During the transition to feeding 1 stage occurs the increase on mitochondrial number and oxidative phosphorylation together with slight decrease in both dismutase and catalase transcript levels resulting on the first peak of H_2O_2 production (**Figure 2**). On the next stage an amazing increase on MnSod and Catalase overcome the increase on oxidative phosphorylation and rescue the H_2O_2 levels. During the next stage (feeding 3) the oxidative phosphorylation remains high, but the antioxidant transcript levels decrease again resulting on the second peak of H_2O_2 production. At the entrance of the cocoon weaving phase the H_2O_2 levels decrease following the decrease on the oxidative phosphorylation. Interestingly despite the oscillation on ROS levels analyzed there are no changes in the redox environment and no tracks of oxidative stress in the fat body of queen larvae (**Figure 4 and 5**).

On the other hand possibly due lower metabolism and lower growth rates founded in worker larvae the antioxidant barrier begin to acts in later stages of development as we have shown (**Figure 3, S1 and S2**). Fat body of worker hasn't high changes on oxidative phosphorylation and has a humble increase on mitochondrial number during development of larvae which could explain the delay in the initiation of the transcription of genes of the antioxidant system (29). Despite that a little alteration on redox environment and ROS signaling were observed during the beginning of feeding stage, the same stage that occurs the mainly peak on transcriptional levels of *Amsima* (6). Alterations on redox environment and increase ROS production is associated to lead HIF1 α (*Amsima*) stabilization through inhibition of prolyl hydroxylases in mammal cells (17). Although H_2O_2 levels are not higher than the queen larvae it is possible to speculate that these levels are sufficient to generate ROS signaling since as stated by Schieber and Chancel, et. al. (2014) changes in H_2O_2 required for signaling do not causes significant changes in intracellular ratio of oxidized glutathione to reduced glutathione, whether large changes in these parameters are usually a sign of oxidative stress causing toxicity rather than redox signaling.

Nevertheless, the reasons of worker larvae have high levels of hypoxia genes remains unresolved. In conclusion, we could show that (i) fat body cell of worker larvae don't suffer Warburg effect, (ii) queen have higher antioxidant genes expression than worker larvae and (iii) both castes fashion these antioxidant barrier differently in response to differential feeding program. These results do not only endorse the critical function of mitochondrial metabolism as well it attributes important role of antioxidants in the fine regulation of the formation of alternative phenotypes in this highly eusocial insect.

Acknowledgment

We thank the technician Luiz R. Aguiar (Dept. Genetics of FMRP-USP) for the rearing of queen larvae and the financial support received from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 013/24733-7).

References

1. Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, Hartfelder K. Caste and metamorphosis - Hemolymph titers of juvenile-hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocr.* 1990;79(1):31-8.
2. Rembold H. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochem.* 1987;17(7):1003-6.
3. Capella ICS, Hartfelder K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *J Insect Physiol.* 1998;44(5-6):385-91.
4. Wheeler DE, Buck N, Evans JD. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect molecular biology.* 2006;15(5):597-602.
5. Dekanty A, Lavista-Llanos S, Irisarri M, Oldham S, Wappner P. The insulin-PI3K/TOR pathway induces a HIF-dependent transcriptional response in *Drosophila* by promoting nuclear localization of HIF-alpha/Sima. *Journal of cell science.* 2005;118(23):5431-41.
6. Azevedo SV, Caranton OAM, de Oliveira TL, Hartfelder K. Differential expression of hypoxia pathway genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *J Insect Physiol.* 2011;57(1):38-45.
7. Osanai M, Rembold H. Development-dependent mitochondrial enzyme activities in castes of honey bee. *Biochim Biophys Acta.* 1968;162(1):22-31.

8. Eder J, Kremer JP, Rembold H. Correlation of cytochrome c titer and respiration in *Apis mellifera* - Adaptive response to caste determination defines workers, intercastes and queens. *Comp Biochem Phys B*. 1983;76(4):703-16.
9. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 Modulates Cellular Responses to Hypoxia by Deacetylating Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Molecular cell*. 2010;38(6):864-78.
10. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014;505(7483):335-43.
11. Palikaras K, Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol*. 2014;56:182-8.
12. Wang WH, He EM, Guo Y, Tong QX, Zheng HL. Chloroplast calcium and ROS signaling networks potentially facilitate the primed state for stomatal closure under multiple stresses. *Environ Exp Bot*. 2016;122:85-93.
13. Andersson-Sjoland A, Karlsson JC, Rydell-Tormanen K. ROS-induced endothelial stress contributes to pulmonary fibrosis through pericytes and Wnt signaling. *Lab Invest*. 2016;96(2):206-17.
14. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia - A mechanism of O_2 sensing. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25130-8.
15. Hagen T. Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1 α : The Balance Tips. *Biochemistry Research International*. 2012;2012(436981):1-5. Epub 2012 Oct 9.
16. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-R62.
17. Li YN, Xi MM, Guo Y, Hai CX, Yang WL, Qin XJ. NADPH oxidase-mitochondria axis-derived ROS mediate arsenite-induced HIF-1 α stabilization by inhibiting prolyl hydroxylases activity. *Toxicol Lett*. 2014;224(2):165-74.
18. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010;45(7-8):466-72.
19. Lambeth JD. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-9.
20. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen Radicals and Human-Disease. *Ann Intern Med*. 1987;107(4):526-45.
21. Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao YP, Ho YS, Reddi AR, et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev*. 2016;96(1):307-64.

22. Rhee SG. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312(5782):1882-3.
23. Michelette ERD, Soares AEE. Characterization of Preimaginal Developmental Stages in Africanized Honey-Bee Workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. 1993;24(4):431-40.
24. Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(11):1230-8.
25. Lourenco AP, Mackert A, Cristino AD, Simoes ZLP. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*. 2008;39(3):372-85.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
27. Reznick AZ, Packer L. Oxidative Damage to Proteins - Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C*. 1994;233:357-63.
28. Hissin PJ, Hilf R. Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214-26.
29. Santos DE, Alberici LC, Hartfelder K. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development. *Insect Biochem Molec*. 2016;73:1-11.
30. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Bio Med*. 2001;30(11):1191-212.
31. Warburg O. Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
32. Thrasyvoulou AT, Benton AW. Rates of growth of honeybee larvae. *J Apicult Res*. 1982;21(4):189-92.
33. Nunes-Silva P, Gonçalves LS, Franco MT, Jong DD. Rate of growth and development time of africanized honey bee (*Apis mellifera*) queens and workers during ontogenetic development. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*. 2006;23:325-32.

Figure legends

Figure 1. Lactate levels in fat body cells throughout of development of queen (gray bars) and worker (black bars) larvae. Data points are means and SEM (n = 4). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test.

Figure 2. H₂O₂ production in fat body cells of queen and worker in the sequential developmental stages. Data points are means and SEM (n = 3). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test.

Figure 3. Transcript levels anti-oxidant enzymes in fat body of queen and worker larvae. Relative quantification of *amMnSod* (A), *amCuZnSod* (B), *amCatalase* (C), *amGtpx* (D) and *amGst1* (E) expression by RT-qPCR. Shown are means and SEM of three biological samples per stage and caste, each analyzed in triplicate. Relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using *rp49* expression for normalization and one of the fourth-instar worker samples as calibrator for each gene. Statistical significance was analyzed by two-way ANOVA and a Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 4. Evaluation of oxidative stress through quantification of carbonyl groups originates of ROS reaction on protein in fat body cells of queen larvae during development of queen and worker larvae. Data points are means and SEM (n = 5). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test.

Figure 5. Evaluation of redox state of fat body cells during development of queen and worker larvae by GSH/GSSG ratio. The levels of GSH and GSSG were measured separately (data showed in supplementary Figure S2) by fluorimetric method, normalized and submitted to the calculation of the ratio. Data points are means and SEM (n = 5). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test (**p<0.01).

Table 1: Primer sequences used for expression analysis antioxidant-related genes in accord to Corona et al., (2005). Shown are the gene names, the BeeBase gene IDs (Amel 4.5), the GenBank accession numbers, and the respective primer sequences for the honey bee genes.

Gene name	BeeBase ID	GenBank ID	Primer sequences	amplicon size (bp)
<i>amMnSOD</i>	GB45099	NM_001178048.1	F: 5'-GGTGGTGGTCATTTGAATCATTC-3' R: 5'-AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC-3'	78
<i>amCuZnSOD</i>	GB47880	NM_001178027.1	F: 5'-GTCGTTCCGTGTAGTCGAGAA-3' R: 5'-TCCTTTGACTTCACCCTGAAGA-3'	73
<i>amGst-1</i>	GB50265	NM_001178028.1	F: 5'-TGCCGATCGATTTTTATCAACTT-3' R: 5'-AGCCGTCAACGCAACTGC-3'	62
<i>amCat</i>	GB41427	NM_001178069.1	F: 5'-TGGAGCAAGTCCTGATAAAATGC-3' R: 5'-TGGGCCAAGACGATGTCTATG-3'	76
<i>amGtpx</i>	GB47478	NM_001178021.1	F: 5'-CGACAACTATAAGGAAGCGAAA-3' R: 5'-AGATAGAAAAACGTCTTCGCCT-3'	76
<i>rp49</i>			Endogenous control gene, see Lourenço et al., 2008	

Legends for Supplementary Material

Figure S1. H₂O₂ production in fat body cells of queen and worker in the sequential developmental stages under stimulus of 40nM of Pyruvate. Data points are means and SEM (n = 3). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test (***) p < 0.001).

Figure S2. Relative expression of antioxidant genes *amMnSod*, *amCuZnSod*, *amCatalase*, *amGtpx* and *amGst-1* during development of queen (A) and worker (B) larvae in *A. mellifera*. Shown are means and SEM of three biological samples per stage and caste, each analyzed in triplicate. Relative expression was calculated through same threshold by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using *rp49* expression for normalization, and one of the fourth-instar worker samples as calibrator for each gene. Statistical significance was analyzed by two-way ANOVA and a Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure S3. Evaluation of redox state of fat body cells during development of queen and worker larvae. The levels of GSH (A) and GSSG (B) were measured separately by fluorimetric method, normalized and submitted to the calculation of the GSH/GSSG ratio. Data points are means and SEM (n = 5). Statistical differences between the two castes were tested by two-way ANOVA with a Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).